

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



**Tomáš Suchý**

Role faktorů regulujících interferon při virových infekcích

The role of Interferon regulatory factors in virus infections

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 5. 2014

Podpis

Chci poděkovat své školitelce doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za vstřícnost, ochotu a cenné rady poskytnuté pro vypracování této práce.

# Obsah

## Seznam použitých zkratk

v

## Abstrakt

vi

## 1. Úvod

1

## 2. Faktor 3 regulující interferon

2

### 2.1. Struktura

2

#### 2.1.1. Izoformy

2

#### 2.1.2. Domény

2

### 2.2. Posttranslační modifikace

3

#### 2.2.1. Fosforylace

3

#### 2.2.2. Ubiquitinace

3

#### 2.2.3. ISGylace

3

#### 2.2.4. Sumoylace

4

### 2.3. Aktivace

4

### 2.4. Regulace

5

#### 2.4.1. Regulace buněčným aparátem

5

#### 2.4.2. Regulace virovými proteiny

6

### 2.5. Funkce

7

#### 2.5.1. Vazba DNA

8

#### 2.5.2. Indukce interferonu $\beta$

9

#### 2.5.3. Indukce interferonu $\alpha$

10

## 3. Faktor 5 regulující interferon

10

### 3.1. Struktura

10

#### 3.1.1. Izoformy

10

#### 3.1.2. Domény

11

### 3.2. Posttranslační modifikace

11

#### 3.2.1. Fosforylace

11

#### 3.2.2. Ubiquitinace

12

### 3.3. Aktivace

12

### 3.4. Regulace

13

#### 3.4.1. Regulace buněčným aparátem

13

#### 3.4.2. Regulace virovými proteiny

14

### 3.5. Funkce

15

#### 3.5.1. Vazba DNA

15

#### 3.5.2. Indukce interferonu $\beta$

15

#### 3.5.3. Indukce interferonu $\alpha$

16

## 4. Faktor 7 regulující interferon

16

### 4.1. Struktura

16

#### 4.1.1. Izoformy

16

#### 4.1.2. Domény

17

### 4.2. Posttranslační modifikace

17

#### 4.2.1. Fosforylace

17

#### 4.2.2. Ubiquitinace

18

#### 4.2.3. Sumoylace

18

#### 4.2.4. Acetylce

19

### 4.3. Aktivace

19

### 4.4. Regulace

20

#### 4.4.1. Regulace buněčným aparátem

20

#### 4.4.2. Regulace virovými proteiny

22

### 4.5. Funkce

23

#### 4.5.1. Vazba DNA

23

#### 4.5.2. Indukce interferonu $\beta$

24

#### 4.5.3. Indukce interferonu $\alpha$

24

## 5. Závěr

27

## 6. Literatura

28

## Seznam použitých zkratek

<b>CBP</b>	CREB-binding protein	CREB vázající protein
<b>DBD</b>	DNA-binding domain	DNA vazebná doména
<b>HMG-I</b>	High mobility group protein I	Protein I ze skupiny proteinů s vysokou mobilitou
<b>HHV 8</b>	Human herpes virus 8	Lidský herpesvirus 8
<b>IAD</b>	IRF association domain	IRF asociační doména
<b>IFN</b>	Interferon	Interferon
<b>IKK</b>	Kinase of kappa B inhibitor	Kináza inhibitoru kappa B
<b>IPS-1</b>	Interferon beta promoter stimulator 1	Stimulátor promotoru interferonu beta
<b>IRAK</b>	Interleukin 1 receptor-associated kinase	Kináza asociovaná s receptorem interleukinu 1
<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor	faktor regulující interferon
<b>ISG</b>	Interferon-stimulated gene	Gen stimulovaný interferonem
<b>ISGF</b>	Interferon-stimulated gene factor	Genový faktor stimulovaný interferonem
<b>ISRE</b>	Interferon-stimulated response element	Element odpovídající na interferonovou stimulaci
<b>LGP2</b>	Laboratory of genetics and physiology 2	Laboratoř genetiky a fyziologie 2
<b>LMP1</b>	Latent membrane protein 1	Latentní membránový protein 1
<b>MDA</b>	Melanoma differentiation-associated protein	Protein asociovaný s diferenciací melanomu
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88	Primární gen 88 odpovídající na diferenciaci myeloidních buněk
<b>NDV</b>	Newcastle disease virus	Virus nemoci Newcastle
<b>NES</b>	Nuclear export signal	Jaderný exportní signál
<b>NFκB</b>	Nuclear factor kappa B	Jaderný faktor kappa B
<b>NLS</b>	Nuclear localization sequence	Jaderná lokalizační sekvence
<b>PARP</b>	Poly (ADP-ribose) polymerase	Poly (ADP-ribóza) polymeráza
<b>pDC</b>	Plasmacytoid dendritic cell	Plazmacytoidní dendritická buňka
<b>PEST</b>	Proline-glutamic acid-serine-threonine	Prolin-glutamová kyselina-serin-threonin
<b>PRD</b>	Positive regulatory domain	Pozitivně regulující doména
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor	Receptor rozeznávající vzorec
<b>RIG</b>	Retinoic acid-inducible gene	Gen indukovatelný retinovou kyselinou
<b>TANK</b>	TRAF family member-associated NFκB activator	Aktivátor NFκB asociovaný s rodinou TRAF
<b>TBK</b>	TANK binding kinase	Kináza vázající TANK
<b>TLR</b>	Toll-like receptor	Receptor podobný Toll receptorům
<b>TRAF</b>	Tumor necrosis factor receptor-associated factor	Faktor asociovaný s receptorem tumor nekrotizujícího faktoru
<b>TRIF</b>	TIR domain containing adapter inducing interferon beta	Adaptor obsahující TIR doménu, indukující interferon beta
<b>vIRF</b>	Viral interferon regulatory factor	Virový faktor regulující interferon

## **Abstrakt**

Viry jsou intracelulární paraziti, kteří při interakci s buňkou vystavují své proteiny a nukleové kyseliny. Imunitní systém hostitele se díky koevoluci s viry naučil rozeznávat tyto komponenty a následně aktivovat obranné mechanismy. Tato práce shrnuje poznatky o vybraných transkripčních faktorech s funkcí interferonových regulátorů. Navození antivirového stavu je komplikovaný a striktně regulovaný proces. Primární funkcí vybraných transkripčních faktorů je propojit detekci viru a syntézu molekul s antivirovým potenciálem. Do práce jsou zahrnuty poznatky o přímé interakci virových proteinů s faktory regulujícími interferon. Tyto znalosti umožňují náhled do molekulárního boje mezi hostitelem a virem. Jak název faktorů napovídá, jejich nejpodstatnější funkcí je vliv na produkci interferonu. Shromažďování informací o koordinaci imunitního systému je prospěšné pro humánní medicínu a budoucí terapeutické účely.

**Klíčová slova:** faktory regulující interferon; virová infekce; regulace vrozené imunity; interferon; rozeznávání patogenů

## **Abstract**

Viruses are intracellular parasites, which expose their proteins and nucleic acids during their interaction with a cell. Thanks to co-evolution the host immune system developed mechanisms how to recognize these components and subsequently activate defensive mechanisms. This work summarizes the knowledge about selected transcription factors with interferon regulatory function. Induction of the antiviral state is complicated and strictly regulated process. Primary function of selected transcription factors is to connect virus detection and synthesis of cellular molecules with antiviral potential. The work includes information about the direct interaction of viral proteins with interferon regulatory factors. These facts enable us insight into the molecular struggle between a host and a virus. As the name of factors suggests, the most important function is to influence the interferon production. Gathering of information about coordination of the immune system is beneficial for humane medicine and future therapeutic purposes.

**Key words:** interferon regulatory factors; viral infection; regulation of innate immunity; interferon; pathogen recognition

# 1. Úvod

Na pozadí každé infekce probíhá souboj mezi patogenem a imunitním systémem hostitele. Vítězství jednoho z nich může mít dopad na celý organismus a určuje jeho další osud. Imunitní systém je velice komplexní struktura, všeobecně dělená na dvě hlavní složky, a to vrozenou a získanou imunitu.

Vrozená imunita reaguje na infekci jako první a spouští mechanismy, jejichž obecným cílem je zabránit replikaci patogenu a zlikvidovat ho. V imunitním systému hrají nezastupitelnou roli cytokiny, což jsou signální molekuly. Interferon (IFN), pojmenovaný podle schopnosti interferovat s virovou replikací, je jedním z nejdůležitějších cytokinů. IFN detekovaný na buněčném receptoru indukuje transkripci genů stimulovaných interferonem (interferon-stimulated genes; ISG), mezi které patří geny pro enzymy omezující virovou replikaci (protein kináza R, RNáza L). Interferon pozitivně ovlivňuje transkripci svého vlastního genu, prostřednictvím genového faktoru 3 stimulovaného interferonem (interferon-stimulated gene factor 3; ISGF3). Interferon by ovšem nemohl fungovat, kdyby jeho transkripce a translace neproběhly při virové infekci. Zde se dostávají ke slovu faktory regulující interferon (interferon regulatory factors; IRF), rodina transkripčních faktorů s komplexní funkcí.

U člověka bylo dosud identifikováno a charakterizováno devět členů rodiny IRF (IRF-1 – 9). Ač jsou mnohé z nich důležité v signálních drahách při organizaci imunitního systému, pouze tři členové (IRF-3, IRF-5 a IRF-7) reagují přímo na virovou infekci a indukují vznik IFN a jiných genových produktů. Ovšem není možné omezovat funkci IRF pouze na indukci genů pro interferon či genů stimulovaných interferonem. Hrají roli také v potlačování onkogeneze a v diferenciaci buněk, na druhou stranu jsou spojovány i s autoimunitními onemocněními.

Homologie mezi členy rodiny IRF je nejvíce patrná v cca 120 aminokyselinách na N konci. Zde se nacházejí DNA vazebné domény a drobné obměny v sekvenci mají podstatný vliv na specifitu vazby mezi proteinem a DNA. V signální transdukcí slouží IRF jak v dráze membránových receptorů, tak i dráze cytozolických receptorů. Aktivací proteinu, která spočívá v posttranslačních modifikacích, je IRF schopen plnit funkci transkripčního faktoru.

Komplexnost systému funkcí, které rodina IRF plní, se nedá smysluplně shrnout do jediné práce. Následující rešerše je zaměřena na IRF-3, IRF-5 a IRF-7, jakožto přímé prostředníky mezi virovou detekcí a produkcí interferonu. Do regulace buněčných pochodů, řízených IRF často zasahují virové proteiny. Některé příklady těchto víceúrovňových interakcí jsou popsány v následující rešerši a dokazují význam IRF pro organizaci imunity. Viry totiž aktivně bojují proti tomu, co je bezprostředně ohrožuje. Zpracování funkce IRF se omezuje především na detaily vztahů mezi jednotlivými faktory a vliv těchto vztahů na produkci interferonových subtypů, což je vysoce organizovaný děj.

## 2. Faktor 3 regulující interferon

IRF-3 byl objeven jako nový člen rodiny IRF díky schopnosti vazby na element odpovídající na interferonovou stimulaci (interferon-stimulated response element; ISRE) v jiné oblasti než IRF-1. První výzkum také poukázal na konstitutivní výskyt v široké škále tkání a nepřítomnost zvýšené hladiny mRNA v důsledku virové infekce (Au et al. 1995), což bylo později vyvráceno (Génin et al. 2009a).

Gen pro IRF-3 byl určen v jedné kopii (Au et al. 1995) a lokalizován v oblasti 19q13.3 – 13.4 (Bellingham et al. 1998), později upřesněné na 19q13.33.

### 2.1. Struktura

#### 2.1.1. Izoformy

Alternativní sestřih transkriptu pro IRF-3 má pravděpodobně vliv na regulaci funkce v určitých buněčných liniích. Jednotlivé izoformy obsahují především delece a vznikající protein interakcí s IRF-3 plně délky zabraňuje jeho funkci jako transkripčního faktoru. Jednou z takových isoform je IRF-3a s delecí poloviny vazebné domény pro DNA. Po aktivaci dimerizuje s IRF-3, ale omezuje vazbu na DNA a slouží tak jako negativní regulátor (Karpova et al. 2001). I alterace v C konci může vytvořit z proteinu negativní regulátor (např. IRF-3CL). Není omezena schopnost vazby k DNA, ale dimer IRF-3 s IRF-3CL není transportován do jádra (Li et al. 2011). Přes množství navržených transkriptů u člověka i u myši, databáze, jako je Uniprot, evidují pět izoform včetně výchozí.

#### 2.1.2. Domény

Délku proteinu IRF-3, odvozeného z nukleotidové sekvence, určili už Au et al. (1995) na 427 aminokyselin a velikost 47kDa (Au et al. 1995). Transaktivace doména byla určena v oblasti aminokyselin 134 až 394. Obsahuje jaderný exportní signál (Nuclear export signal; NES), na prolin bohatou doménu a doménu pro asociaci s IRF (IRF association domain; IAD). Neaktivitu IRF-3 v neinfikovaných buňkách zajišťují dvě autoinhibiční domény na C a N konci, které spolu interagují. Autoinhibice je narušena fosforylací v oblasti aminokyselin 395 až 407 a na serinu 385 a serinu 386 (Lin et al. 1999).

DNA vazebná doména (DNA binding domain; DBD) je na N konci a obsahuje tryptofanovou pentádu, typickou pro rodinu IRF (Escalante et al. 1998). Konsenzus sekvence pro vazbu DNA v DBD IRF-3, je velice striktní a odpovídá 5'-GAAANNGAAANN-3' (Lin et al. 2000b).

Při studiu krystalové struktury C konce IRF-3 (175-427; IRF-3C175) bylo objeveno několik reziduí pro fosforylaci ve dvou oblastech na úplném C konci. Zde je na serin bohatá oblast. Klíčové seriny 385 a 386 jsou v oblasti relativně přístupné pro fosforylaci. Po modifikaci pravděpodobně dochází ke strukturní změně v oblasti bližší C-konci. Seriny (396, 398, 402, a 405) a threonin 404 této oblasti mohou být po strukturní změně přístupnější enzymům. Výjimkou jsou serin 402 a threonin 404, jejichž přístupnost je odpovídající aminokyselinám 385-386 (Takahasi et al. 2003).



V DBD byla nalezena jaderná lokalizační sekvence (nuclear localization sequence; NLS) a její funkční antagonist, jaderný exportní signál v oblasti bohaté na prolin. NLS i NES se projevují jako stále aktivní, ale jsou rozpoznávány pouze určitým podtypem importin- $\alpha$  kyvadlových „shuttling“ receptorů (Kumar et al. 2000). NES byla lokalizována v oblasti aminokyselin 139 až 149 (Yoneyama et al. 1998).

## **2.2. Posttranslační modifikace**

### **2.2.1. Fosforylace**

Ve výše zmíněné studii krystalu IRF-3C175 byly přesně určeny aminokyseliny vystavené fosforylaci. Za fosforylující enzymy byly označeny kináza  $\epsilon$  inhibitoru kappa B (IKK $\epsilon$ ) a kináza 1 vázající TANK (TBK1), hrající roli v signalizaci přes TLR3 (Fitzgerald et al. 2003). Kooperace těchto dvou kináz byla prokázána na myších embryonálních fibroblastech s deficiencí pro TBK1, kdy byla aktivace IRF-3 narušena (Hemmi et al. 2004).

Serin 386 byl určen jako cíl fosforylace při virové infekci pomocí specifické protilátky jako proby, detekující jeho posttranslační modifikaci (Mori et al. 2004). Kromě serinu 386 nejsou přímé důkazy pro fosforylaci ostatních kandidátních aminokyselin. Vyskytují se v motivech SXSXXS, typických pro IRF-3. Tyto motivy jsou dále rozeznávány TBK1 a IKK $\epsilon$  kinázami *in vitro* (Paz et al. 2006).

Alternativní dráha vede přes fosfatidylinozitol 3-kinázu. Po stimulaci TLR3 se místo TBK1 může vázat tato alternativní kináza a fosforylovat IRF-3. Buňky s blokací této dráhy pouze částečně fosforylují IRF-3 (Sarkar et al. 2004).

### **2.2.2. Ubiquitinace**

K degradaci směřující ubiquitinace byla u IRF-3 pozorována v různých enzymatických drahách. Po infekci Sendai virem se IRF-3 váže na Cullin1, což je „scaffold“ protein účastnící se sestavení ubiquitinačního komplexu. Tato interakce a řízená degradace aktivovaného proteinu, by vysvětlovala jeho krátký poločas v infikovaných buňkách (Bibeau-Poirier et al. 2006). Peptidyl-prolyl izomeráza také zaměřuje IRF-3 k degradační ubiquitinaci. Interaguje s motivem serin-prolin (339-340), kde serin je fosforylován v důsledku aktivace IRF-3 stimulem z dsRNA. Dráha je dalším důkazem pro zvýšenou degradaci aktivovaného IRF-3 buněčným aparátem (Saitoh et al. 2006). Trojdílný motiv obsahující protein 21 (tripartite motif-containing protein 21) svou E3 ligázovou aktivitou hraje roli v proteazomální degradaci IRF-3 a oslabení interferonové produkce po infekci (Higgs et al. 2008). Nadbytečná produkce IFN může vyvolat autoimunitní onemocnění (Baccala et al. 2007 rev).

### **2.2.3. ISGylace**

Role ISG15, ubiquitin podobného proteinu, jako posttranslačního modifikátoru IRF-3, je pozitivní. Název napovídá, že produkce ISG15 je zvýšena při virové infekci i aplikaci IFN. Schopností navázaného ISG15 je zvrátit ubiquitinační cílení k proteazomální degradaci. ISGylovaný IRF-3 ochotněji vstoupí do jádra a je zlepšena jeho transkripční aktivita na IFN $\beta$  promotoru. Více

produkovaného IFN $\beta$ , cíleného autokrinně, uzavírá pozitivní regulační cyklus (Lu et al. 2006). Modifikace lysinů (193, 360 a 366) oslabuje vazbu IRF-3 s peptidyl-prolyl izomerázou a zabraňuje degradační ubiquitinaci (Shi et al. 2010).

#### **2.2.4. Sumoylace**

Malý, ubiquitinu podobný, modifikátor má na stabilitu IRF-3 negativní vliv. Na myším modelu byla prokázána vazba SUMO1-3 na lysinu 152, který nemá homologního partnera u lidského IRF-3. Opět zde může hrát roli oslabení produkce IFN v průběhu infekce (Kubota et al. 2008).

### **2.3. Aktivace**

Na rozdíl od svého transkripčního partnera, IRF-7, je IRF-3 produkován a stabilní ve většině tkání (Au et al. 1995). Byly zjištěny relativně vyšší hladiny u buněk imunitního systému a také u Burkittova lymfomu a kolorektálního adenokarcinomu (Su et al. 2004). Neaktivní IRF-3 se nachází v cytoplazmě, ale pravděpodobně ne nastalo. Existuje model, kdy neaktivní IRF-3 pendluje mezi jádrem a cytoplazmou pomocí kyvadlových receptorů, rozeznávajících NLS i NES. V neinfikované buňce signalizace pro export z jádra převažuje. Po infekci, fosforylaci IRF-3 a jeho vcestování do jádra, vytváří komplex s CBP/p300, heterodimerem s funkcí kotranskripčního faktoru. Interakce pravděpodobně omezuje schopnost NES signalizovat export z jádra a IRF-3 se zde hromadí (Kumar et al. 2000).

Vliv fosforylace na aktivaci a následnou dimerizaci může být dvojitý. Odpuzování stejného náboje u fosforylovaného IRF-3 způsobí rozvolnění struktury. Autoinhibiční domény uvolní hydrofobní povrch IAD a ten se váže na stejný povrch u druhého IRF (Chen et al. 2008b). Druhou možností je přímá účast fosforylovaných aminokyselin v dimerizaci. Ústřední roli hraje leucin 387, jehož postranní řetězec je po aktivaci a sterických změnách odhalený. Leucin 387 vtáhne smyčku bohatou na seriny vlastního IRF-3 do hydrofobní kapsy v IAD druhého IRF-3. Hydrofobní kapsa je ohraničena čtyřmi konzervovanými bazickými zbytky, které stabilizují vazbu vodíkovými můstky s fosforylovanými seriny 385 a 386 (Takahasi et al. 2003).

Cytoplizické receptory molekulárních vzorců patogenů se účastní aktivace IRF-3. RIG-I, cytosolický receptor dsRNA, zaznamenává přítomnost patogenu a signální transdukcí vede k aktivaci nejen IRF-3 (Yoneyama et al. 2004). V buňkách, ve kterých není produkován RIG-I, nebyl indukován IFN typu I a aktivace IRF-3 byla oslabena. RIG-I je pravděpodobně jedním z hlavních receptorů, aktivujících IRF-3 (Kato et al. 2005).

Strukturně i funkčně podobný receptoru RIG-I je MDA5 receptor. Zaznamenává dsRNA pomocí stejných domén jako RIG-I a signální transdukcí vede až k aktivaci IRF-3 (Yoneyama et al. 2005). Svou roli v signální dráze, vedoucí k aktivaci IRF-3, hraje IPS-1, protein umožňující kontakt RIG-I/MDA5 a nutných koreceptorů a kináz (Kawai et al. 2005).

Stimulátor interferonových genů je adaptorový protein vázaný na endoplazmatické retikulum. Při jeho objevu se prokázalo, že je schopen navodit antivirový stav, a to přes indukci aktivace IRF-3 (Ishikawa a Barber 2008). Savčí buňky, transfekované DNA nebo infikované DNA virem, syntetizovaly cGAMP (cyklické AMP a GMP). cGAMP funguje jako druhý posel a váže se na tento adaptor, což vede k aktivaci IRF-3 (Wu et al. 2013).

DNA dependentní aktivátor faktorů regulujících interferon registruje přítomnost B-DNA v buňce. Komplex DNA dependentního aktivátoru IRF se substrátem (DNA) váže IRF-3 i TBK1 a usnadňuje kináze fosforylaci IRF-3 (Takaoka et al. 2007).

Toll-like receptor 4 na vnější buněčné membráně registruje obalový F protein respiračního syncytiálního viru (RSV; *Paramyxoviridae*) (Kurt-Jones et al. 2000) a signalizuje přes dvě odlišné dráhy. Využívá MyD88 adaptor a TRIF adaptor, přičemž dráha vedoucí přes TRIF je majoritní (Akira et al. 2006 rev.).

Toll-like receptor 3 se nachází na membráně endozomu a využívá pouze TRIF dependentní signalizaci. Rozpoznává dsRNA, jako součást genomu patogenu, i jako mezistupeň jeho replikace, takže registruje i ssRNA (Alexopoulou et al. 2001). V signální dráze TLR3 a TLR4 se uplatňují TRAF proteiny. Dříve uvažovaný TRAF6, fungující v signální dráze IRF-7, nebyl potvrzen v TRIF dependentní dráze pro IRF-3 (Gohda et al. 2004). Naopak TRAF3 byl potvrzen jako nezbytný člen signalizační dráhy mezi TLR a IRF-3 (Oganesyan et al. 2006).

## 2.4. Regulace

### 2.4.1. Regulace buněčným aparátem

Signální dráhy, vedoucí k aktivaci IRF-3, jsou regulovány v mnoha krocích pozitivně i negativně. Stále udržovaná hladina IRF-3 v převážné většině tkání umožňuje rychlejší využití jeho transkripčního potenciálu při indukci IFN typu I, převážně IFN $\beta$ .

Negativní regulátor, který cílí IRF-3 na TBK1, se váže i na receptor RIG-I. Svou deubiquitinační aktivitou odstraňuje ze substrátu přes lysin 63 vázané polyubiquitinové řetězce a deaktivuje tak funkci celé dráhy (Friedman et al. 2008). Pozitivní roli hraje zkrácená forma PARP 13 (poly ADP-ribóza polymeráza), která usnadňuje vazbu mezi RIG-I a IRF-3, při stimulaci dvouvláknovou pppRNA (Hayakawa et al. 2011).

U proteinu LGP2 se původně předpokládala funkce negativního regulátoru. LGP2 je helikáza, příbuzná RIG-I a MDA5, indukovatelná IFN i infekcí Sendai virem. Může kompetovat o vazebné místo na IPS-1 s IKK $\epsilon$  (Komuro a Horvath 2006). Také byl u proteinu LGP2 nalezen analog represorové domény RIG-I, díky které může blokovat signalizaci tohoto receptoru (Saito et al. 2007). Obě funkce mohou negativní zpětnou vazbou regulovat na IRF-3 závislou indukci IFN typu I. Novější studie prokázala, že ATPázová doména LGP2 je nezbytná pro spuštění signální dráhy po infekci pikornavirem a uvažuje možnou, pozitivně regulující, funkci (Sato et al. 2010). Další práce na toto

téma ukázala, že pro detekci RNA LGP2, je důležitá její sekvence, kterou neregistruje receptor RIG-I a pravděpodobně je mu přes LGP2 zprostředkována (Deddouche et al. 2014).

#### 2.4.2. Regulace virovými proteiny

Viry vyvinuly mnoho unikátních mechanismů pro uniknutí obranným systémům hostitele. IRF-3 je transkripční faktor hrající roli při indukci interferonu typu I, a proto je často cílem virových proteinů. Negativní regulace virovými proteiny zahrnuje přímou interakci proteinu s IRF-3 nebo nepřímé působení, a to na signální dráhy vedoucí k aktivaci IRF-3.

Virové proteiny, které se zaměřují na regulaci adaptorových proteinů toll-like receptorů, ovlivňují navození antivirového stavu širokým záběrem. Při degradaci adaptorové molekuly je ovlivněna celá řada indukovaných molekul, mimo jiné i IRF-3. *In vitro* i *in vivo* experimenty ukázaly schopnost 3C proteinu enteroviru 71 (*Picornaviridae*) vázat se na TRIF adaptorovou molekulu a proteolyticky ji štěpit. Přerušená signalizace přes TLR3 neumožní aktivaci IRF-3 i jiných transkripčních faktorů, jako je NFκB (Lei et al. 2011). Vysoko v signální dráze působí e antigen viru hepatitidy B. Antigen svou sekvencí napodobuje faktory vázané na toll-like receptory, které přes ně rekrutují TRIF a MyD88. Kompeticí o adaptorové molekuly TRIF a MyD88, tlumí signální dráhy toll-like receptorů, vedoucí k aktivaci IRF-3 i jiných členů rodiny IRF (Lang et al. 2011). Nepřímě je ovlivněn IRF-3 i nestrukturními proteiny 3 a 4A, tvořícími heterodimer u viru hepatitidy C (*Flaviviridae*). Adaptorový protein TRIF je proteázovou aktivitou heterodimeru naštípán a deaktivován (Li et al. 2005).

Virové proteiny, které jsou zacíleny na molekuly v signální dráze sestupně od receptorů rozeznávajících vzorce (pattern recognition receptor; PRR) a jejich adaptorů, regulují už jen užší skupiny antivirových proteinů. Kinázu TBK1 váže gama protein (34.5) viru herpes simplex (*Herpesviridae*). N konec proteinu inhibuje aktivitu TBK1 a zabraňuje fosforylaci IRF-3, čímž virus zamezuje navození antivirového stavu v plné míře (Ma et al. 2012). Domény na obalových glykoproteinech některých hantavirů vážou několik molekul v signální dráze pro indukci IFNβ. Vazbou je blokována funkce TRAF3, IPS-1 i TBK1. Analýzou substitučních mutant byl odhalen tyrosin 627 glykoproteinu, jako nezbytný pro negativní regulaci fosforylace IRF-3 (Matthys et al. 2014).

IKKε je cílem nukleoproteinu arenavirů, které svou vazbou brání autokatalytické aktivitě kinázy. Infekce virem lymfocytické choriomeningitidy ukázala, že nukleoprotein s navázanou kinázou je lokalizován na vnější membráně mitochondrií (Pythoud et al. 2012). Virus horečky Dengue (*Flaviviridae*) produkuje nestrukturní protein 2B/3, který se váže na IKKε a maskuje její kinázovou doménu. Kináza, neschopná fosforylace IRF-3 na klíčovém serinu 386, přeruší dráhu vedoucí k indukci genů stimulovaných interferonem (ISG) (Anglero-Rodriguez et al. 2014). Protein C6 vaccinia viru (*Poxviridae*) omezuje funkčnost TBK1 interakcí s jeho nosnými „scaffold“ proteiny. C6 omezuje ve funkčnosti také IKKε a snížená je hladina nejen IRF-3, ale také IRF-7 (Unterholzner et al. 2011). Kromě proteinů jsou signální dráhy také pod vlivem nukleových kyselin. MikroRNA Lidského herpesviru 8 (HHV 8), asociovaného s Kaposiho sarkomem (*Herpesviridae*), označovaná miR-K 12-

11, interaguje s mRNA kinázy IKK $\epsilon$  a zabraňuje její translaci. Snížená hladina kinázy způsobuje defektní produkci IRF-3 i IRF-7 (Liang, D. G. et al. 2011).

Interakcí virového proteinu přímo s IRF-3 dochází k nejspecifičtější negativní regulaci antivirového stavu. IRF jsou v imunitě natolik významné, že HHV 8 kóduje jejich homology, označované jako virové faktory regulující interferon (viral interferon regulatory factors; vIRF). vIRF-1 se váže na IRF-3 a maří jeho interakci s CBP/p300, nezbytnou součástí promotorového komplexu (Lin et al. 2001). Funkce vIRF-2 je pleiotropní a omezuje signalizaci z receptoru IFN typu I, vazbou na genový faktor 3 stimulovaný interferonem (Mutocheluh et al. 2011).

Varicella zoster, virus planých neštovic (*Herpesviridae*) kóduje kinázu ORF47, která fosforyluje IRF-3. K modifikaci nedochází na serinu 396 a atypická fosforylace zabraňuje dimerizaci IRF-3 a jaderné translokaci (Vandevenne et al. 2011). Další z proteinů viru planých neštovic, ORF61, zasahuje už aktivovaný IRF-3 v jádře modifikací svou ubiquitin ligázovou aktivitou. Ubiquitínovaný protein opět vycestuje z jádra a je degradován v proteazomu (Zhu et al. 2011). Jiný člen čeledi *Herpesviridae*, herpes simplex virus 1 využívá nadbytečné fosforylace IRF-3. Virem kódovaná kináza US3 modifikuje IRF-3 na serinu 175 a tím zabraňuje jeho aktivaci (Wang et al. 2013). Proteiny viru lidské imunodeficience (*Retroviridae*) Vpr a Vif zprostředkovávají ubiquitinaci IRF-3, nezávisle na jeho aktivitě, a následnou degradaci v proteazomu (Okumura et al. 2008). Protein Vpu také interaguje s IRF-3 a cílí ho do endolysosomu (Doehle et al. 2012). Omezení funkce IRF-3 nemusí být nutně spojeno pouze s posttranslační modifikací či degradací. Nestrukturní protein 1 respiračního syncytiálního viru váže IRF-3 i CBP, koaktivátor a součást promotoru pro IFN typu I. Svou interakcí s oběma transkripčními partnery zabraňuje jejich vzájemné vazbě a aktivitě (Ren et al. 2011).

## 2.5. Funkce

Konstitutivně produkovaný IRF-3 slouží v buňkách pro rychlou reakci na virovou infekci. Svou stálou přítomností indukuje produkci IFN $\beta$  (Schafer et al. 1998), bez ohledu na v tu chvíli nedostupný IRF-7. Sám je také schopen aktivace některých genů stimulovaných interferonem (ISG) (Grandvaux et al. 2002). Brzká indukce IFN $\beta$  umožní svou autokrinní sekrecí spustit druhou vlnu exprese IRF a ISG. V druhé vlně se uplatňuje v tu chvíli už produkovaný IRF-7, který s IRF-3 kooperuje při indukci subtypů IFN $\alpha$ . Druhá vlna cytokinové produkce, umožněná aktivitou IRF-3, ovlivňuje, kromě zahájení indukce exprese IFN $\beta$ , také dobu jejího trvání (Ye a Maniatis 2011). Obecně platí, že přítomnost IRF-3 v promotoru omezuje možnosti vazby celého enhanceozómu. Rozdíly v aminokyselinové sekvenci, mezi členy IRF jinak konzervované DNA vazebné domény, určují variabilitu sekvence vázané DNA. Nukleotidové změny v DBD tedy ovlivňují jaké formy 5'-GAAANNGAAANN-3' sekvence budou vázány, a které protein vázat nebude, například kvůli sterickým překážkám.

Kromě produkce cytokinů se IRF-3 angažuje také v apoptóze. Infekce paramyxoviry je dostatečná pro IRF-3 zprostředkovanou apoptózu v lidských buněčných liniích (Heylbroeck et al. 2000). Při

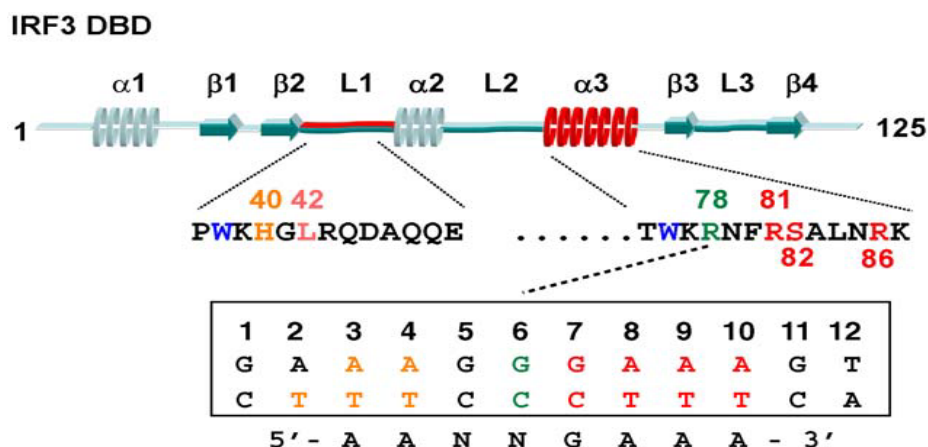
reovirové infekci bylo zjištěno, že hlavní roli při vyvolání IRF-3 zprostředkované apoptózy má protein IPS-1, mediátor signalizace cytozolických receptorů (Holm et al. 2007). IRF-3, který indukuje apoptózu, vyžaduje přítomnost TRAF6 a TRAF2 proteinů a tím se odlišuje od formy IRF-3 indukující IFN typu I (Chattopadhyay et al. 2010).

### 2.5.1. Vazba na DNA

Konsenzus sekvence rozeznávaná pomocí DNA vazebných domén IRF je 5'-AANNGAAA-3' (Fujii et al. 1999). Z krystalových struktur enhanceozomu *Irfb* byl určen význam jednotlivých aminokyselin a detail jejich interakcí s nukleotidy. Jelikož jsou si DBD v rodině IRF strukturně velice blízké, roli při vazbě sekvence vždy hraje smyčka 1 (Loop1; L1) a alfa helix 3 ( $\alpha 3$ ) (Obrázek 2.1.). Obě struktury ve velké míře ovlivňují preferenci vazebné domény pro určitou nukleotidovou sekvenci DNA (De Ioannes et al. 2011).

Asparagin 79, arginin 81 a serin 82 v  $\alpha 3$  DNA vazebné doméně IRF-3, určují centrální sekvenci GAAA (5'-AANNGAAA-3'). Histidin 40 v L1, svým kontaktem přes molekulu vody v malém žlábků DNA, určuje AA dinukleotid, směrem k 5'konci sekvence (5'-AANNGAAA-3'). Tyto aminokyseliny jsou konzervované v rámci rodiny IRF a potvrzují sekvenci 5'-AANNGAAA-3' jako obecný konsenzus pro vazbu DNA vazebné domény (Panne et al. 2007).

Omezení ve variabilitě sekvence DNA způsobují nekonzervované argininy 78 a 86 v  $\alpha 3$  a leucin 42 v L1. Leucin 42, stejně jako histidin 40, svým kontaktem v malém žlábků určuje nukleotid v 5'směru. Preference je pro A nebo T (5'-A/TAANNGAAA-3') a není umožněna přítomnost G, který je DNA vazebnou doménou IRF-7 tolerován. Dva nekonzervované argininy v  $\alpha 3$  DNA vazebné domény určují preferenci pro G nebo C na místě uvnitř konsenzus sekvence a směrem 3' (5'-AANG/CGAAAG/C-3') (Escalante et al. 2007).



Obrázek 2.1. Schematický detail terciální struktury DBD IRF-3. Pozice aminokyselin v alfa helixu 3 ( $\alpha 3$ ) a smyčce 1 (L1) jsou číslovány. Barva na sekvenci nukleotidů a aminokyselin odpovídá vzájemné interakci. Upraveno dle Génin et al. (2009b rev.)

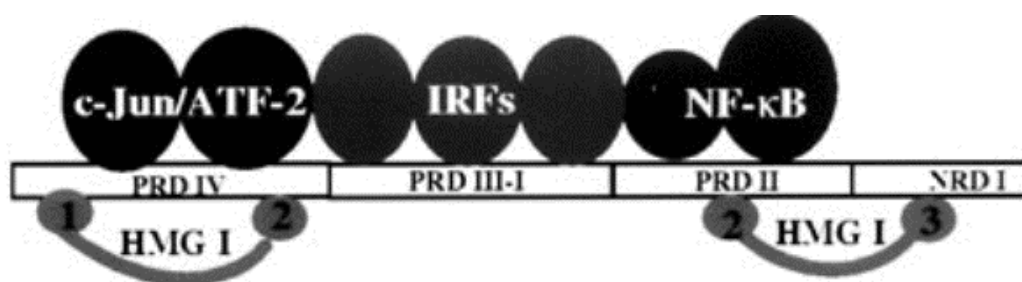
### 2.5.2. Indukce interferonu $\beta$

IFN $\beta$  má u člověka jen jeden subtyp, kódovaný jedním genem (Diaz et al. 1995). IRF-3 je v rodině IRF majoritním faktorem spouštějícím indukci IFN $\beta$ , a to jako součást enhanceozómu (Thanos a Maniatis 1995).

Skládání proteinů v enhanceozóm je vysoce organizovaný děj a IRF-3 nepotřebuje nezbytně jiného člena rodiny IRF pro úplnou funkčnost. Před genem pro IFN $\beta$  jsou čtyři pozitivně regulující domény (Positive regulatory domain; PRD-I – IV), na které se vážou jednotlivé proteiny komplexu enhanceozómu. IRF-3 se jako dimer váže na PRD-I a PRD-III (Wathelet et al. 1998), jiný komplexový protein, NF $\kappa$ B (skládáný z podjednotek p50 a p65), se váže na PRD-II (Lenardo et al. 1989). Na PRD-IV se vážou další spolupracující transkripční faktory (Du a Maniatis 1992).

Skládání enhanceozómu je pro gen interferonu  $\beta$  nezbytné, jelikož jeho promotorová sekvence je kryta nukleozómem (Agalioti et al. 2000). Při postupném sestavování enhanceozómu, se první váže NF $\kappa$ B, který umožní navázání proteinu I skupiny proteinů vysoké mobility (High mobility group protein I; HMG-I). Dva kooperující HMG-I vážou přes malý žlábek dvakrát oblast PRD-IV a jednou oblast PRD-II. DNA vazebné domény proteinu HMG-I ohnou dvojšroubovici DNA a zpřístupní ostatní pozitivně regulující domény (Yie et al. 1997).

IRF-3 váže v oblasti PRD-I a III dva homo- či heterodimery (společně s IRF-7). Proteinové interakce mezi IRF-3 a heterodimery okolních transkripčních faktorů jsou nezávislé na orientaci, ale změna orientace může vyústit v odlišnou míru transkripce genu pro IFN $\beta$  (Burns a Kerppola 2012). Všechny faktory jsou schopny vázat CBP/p300 samostatně, ale kooperace všech vazbu zesiluje a vytváří specifickou trojrozměrnou strukturu (Merika et al. 1998) (Obrázek 2.2.). Remodelační komplex vázaný přes CBP rozvolňuje chromozomovou strukturu a nastupující polymeráza s transkripčními faktory exprimuje *Ifnb* (Agalioti et al. 2000).



Obrázek 2.2. Jednotlivé komponenty složeného enhanceozómu na sekvenci před genem pro IFN $\beta$ . Znáznorněny jsou pozitivně regulující domény (PRD-I – IV) a negativně regulující doména (NRD-I). Číselně jsou značeny DNA vazebné domény HMG-I proteinů. Podjednotky p50 a p65 tvoří komplex NF $\kappa$ B. V oblasti PRD-IV se vážou spolupracující transkripční faktory. Upraveno dle Yie et al. (1999).

### 2.5.3. Indukce interferonu $\alpha$

Indukce IFN $\alpha$  následuje v druhé vlně po indukci IFN $\beta$ . IFN $\beta$  indukované faktory stále přítomnými v buňce, jako je IRF-3, slouží jako první ustalovač antivirového stavu. Následně umožňuje expresi genu pro IRF-7, který majoritně působí na diferenciaci produkce subtypů IFN $\alpha$ . U člověka je 13 genů pro IFN $\alpha$  a 12 výsledných proteinových subtypů (Diaz et al. 1995).

Geny pro subtypy mají dvě někdy i tři regulační domény (B, C a D). C doménu, která nukleotidovou sekvencí preferuje vazbu IRF-3, mají jen geny *ifna1* a *ifna13*, které kódují stejný protein (Génin et al. 2009a, Mogensen et al. 1999). I přestože IRF-3 sám indukuje vznik IFN $\alpha$  *in vivo* jen u subtypu *ifna1* (*ifna13*), extrémně zvýšená produkce IRF-3 umožní slabou indukci i jiných subtypů. Při poměru IRF-3 mRNA a IRF-7 mRNA 400:1, je pozorovatelná indukce subtypů *ifna5*, *ifna2* a *ifna8* (Génin et al. 2009a) (Obrázek 4.3.).

Právě poměr mezi IRF-3 a IRF-7 je určující okolností diferenciaci exprese genů pro subtypy IFN $\alpha$ , což bylo prokázáno použitím ribozymu zacíleného na mRNA IRF-3 (Yeow et al. 2001). Snížená hladina vedla nejen k atenuaci produkce IFN $\beta$ , ale také subtypů IFN $\alpha$ . Mechanismus regulace IFN $\alpha$  hladinou IRF-3 je úzce spojen s přítomností IRF-7, a proto je tento vzájemný vztah rozebrán v kapitole o faktoru 7 regulujícím interferon.

## 3. Faktor 5 regulující interferon

První charakterizaci IRF-5 provedli Barnes et al. (2001). Sekvenci cDNA IRF-5, uloženou v genové bance, srovnávali s databázemi a našli shodné sekvence v knihovnách sekvencí dendritických buněk a B lymfocytů. Nalezené sekvence měli oproti těm z genové banky vnitřní delecí a šlo o transkripty izoform, vytvářených alternativním sestřihem.

Gen pro IRF-5 byl lokalizován na chromozomu 7q32 v klastru imprintovaných genů (Barnes et al. 2001).

### 3.1. Struktura

#### 3.1.1. Izoformy

Různorodost transkriptů IRF-5 je ovlivněna buněčným typem i rozdílnou regulací za určitých podmínek. Lidské buňky bez malignit jsou schopny produkovat celkem až šest druhů IRF-5. Varianty V5 a V6 jsou omezeny na buňky periferní krve a obsahují rozsáhlejší delecí než ostatní izoformy IRF-5. Pravděpodobně ne všechny izoformy reagují na virovou infekci stejně. V1 a V3 jsou indukovány v infikované buňce. Promotor před genem izoformy V1 obsahuje IRF vazebný element, zatímco promotor V3 váže genový faktor 3 stimulovaný interferonem. ISGF3 reaguje na přítomnost IFN na receptoru a v signální transdukcii funguje jako transkripční faktor pro IRF-5. Číslování aminokyselinových zbytků v celé kapitole se vztahuje k izoformě 4 o délce 488 aminokyselin, jelikož ta má největší potenciál indukovat IFN typu I (Mancl et al. 2005).



Mancl et al. (2005) identifikovali také izoformy spojené s rakovinným bujením. Mutace v transkriptech IRF-5 rakovinnou buňkou je pochopitelná, jelikož IRF-5 je spouštěčem apoptózy a může ohrozit imortalizaci buněk (Hu a Barnes 2006).

### 3.1.2. Domény

Rodinu IRF určuje homologní DNA vazebná doména s tryptofanovou pentádou (Escalante et al. 1998). Ta pokrývá u IRF-5 přibližně 120 aminokyselin na N konci. Na rozdíl od IRF-3 a IRF-7, má IRF-5 dvě jaderné lokalizační sekvence (NLS) (Barnes et al. 2002). Jedna je v oblasti N konce a je homologní s ostatními NLS. Druhá NLS se nachází na C konci, v oblasti dimerizace aktivovaných IRF a není jisté, do jaké míry přispívá k jaderné lokalizaci dimeru s IRF-5 (Chen et al. 2008b). Na druhou stranu, dvě NLS by vysvětlovaly detekci IRF-5 v jádře neinfikovaných buněk (Barnes et al. 2001).

Jaderný exportní signál (NES) v oblasti aminokyselin 150 až 160 se společně s NLS podílí na kyvadlovém transportu IRF-5. Tento modelový mechanismus, nastíněný u IRF-3, se zdá u IRF-5 pravděpodobnějším (Lin et al. 2005).

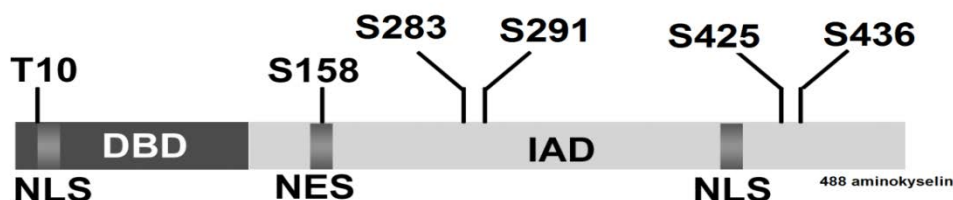
IRF asociační doména (IAD) a inhibiční doména jsou u všech IRF, kromě IRF-1 a IRF-2. Pozice oblastí obou domén jsou homologní mezi členy IRF rodiny. Inhibiční doména je u IRF-5 lokalizována na úplném C konci a pozičně jí předchází IAD (Barnes et al. 2002).

## 3.2. Posttranslační modifikace

### 3.2.1. Fosforylace

Analýzou substitučních mutant byly určeny seriny 158 a 283 IRF-5, jako cíle specifické fosforylace kinázou TBK1 (Foreman et al. 2012). Aktivita kináz TBK1 a IKK $\epsilon$ , hrajících významnou roli v aktivaci IRF-3 a IRF-7, byla potvrzena i při fosforylaci IRF-5 (Cheng et al. 2006) Dále je důležitá i fosforylace kinázou IKK $\alpha$  (Balkhi et al. 2010).

Analýzou transfekovaných buněk, produkujících IRF-5 a TBK1 a TRAF6, určili Foreman et al. (2012) celkem šest fosforylačních míst. Kromě serinů 158 a 283, specifických pro TBK1, jde o threonin 10 a seriny 291, 425 a 436 (izoformy 4; délka 488 aminokyselin) (Obrázek 3.1.). IRF-5 podléhá acetylaci na C konci prostřednictvím histon acetyltransferáz, což umožňuje jeho funkci jako transkripčního faktoru (Feng et al. 2010).



Obrázek 3.1. Schematická struktura IRF-5 se zvýrazněnými pozicemi fosforylace. NLS značí jaderné lokalizační sekvence. NES je jaderný exportní signál. Jako DBD a IAD jsou označeny DNA vazebná doména a IRF asociační doména. Pozice aminokyselin odpovídá izoformě 4 o velikosti 488 aminokyselin. Upraveno dle Foreman et al. 2012.

### 3.2.2. Ubiquitinace

Významný vliv na aktivitu IRF-5 má protein TRAF6, signální přenašeč v dráze zprostředkované toll-like receptory. Jeho E3 ubiquitin ligázová aktivita přímo modifikuje IRF-5 na dvou místech na C konci, přes lysin 63 ubiquitinu. Ubiquitinace je na lysinech 401 a 402 (izoformy 4; délka 488 aminokyselin) a je nezbytná pro aktivitu IRF-5. Modifikaci IRF-5 pomocí TRAF6, předchází nezbytná interakce s kinázami IRAK1/4 a aktivace TRAF6 proteinu (Balkhi et al. 2008).

TRAF6 svou E3 ligázovou aktivitou také modifikuje s protein 2 interagující s receptorem, který hraje roli v signalizaci při bakteriální infekci (Yang et al. 2007). I přes odlišný stimulační patogen, dochází pravděpodobně k modifikaci ve stejných pozicích na IRF-5, jelikož bez ohledu na stimulaci přes toll-like receptor či receptor bakteriálních komponent, IRF-5 dimerizuje a hromadí se v jádře (Chen et al. 2008b).

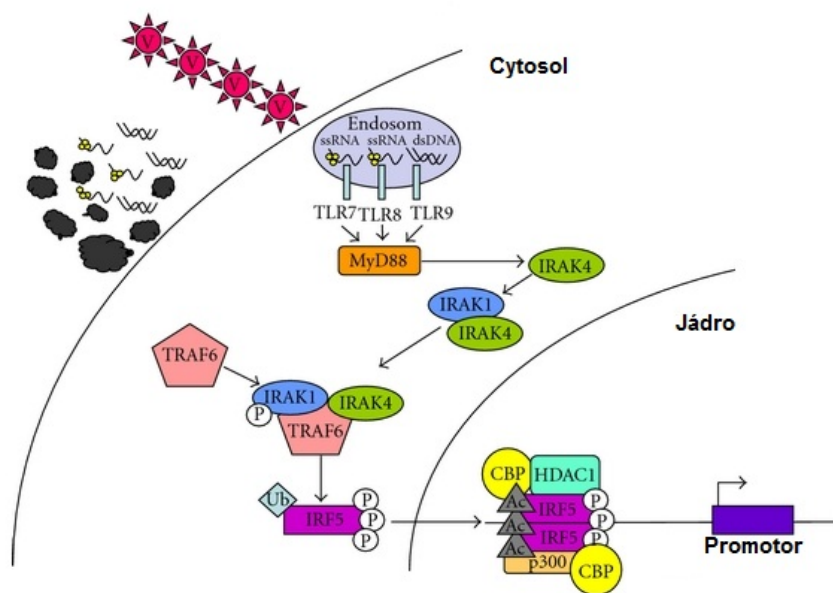
### 3.3. Aktivace

Přítomnost IRF-5 je markantní obzvláště v buňkách imunitního systému, jako jsou makrofágy, lymfocyty i dendritické buňky. Jednotlivé izoformy jsou také specifické pro určité buněčné linie. Zvýšená hladina IRF-5 je detekovatelná ve většině tkání po stimulaci receptorů rozeznávajících molekulární vzorce patogenů (Mancl et al. 2005).

V buněčné lokalizaci IRF-5 hrají roli NLS a jejich antagonist, NES. Podobně jako je tomu u IRF-3, i zde spolupráce NES a exportinu 1 převažuje u nefosforylovaného IRF-5 (Lin et al. 2005). Fosforylace reziduí v oblasti kolem NES má vliv na jeho funkci. Jmenovitě fosforylace serinu 158 uvnitř NES stačí pro jadernou akumulaci IRF-5, přestože není transkripčně aktivní (Lin et al. 2005, Foreman et al. 2012).

Role cytosolických receptorů virové RNA, jako jsou RIG-I a MDA5, byly v aktivaci IRF-5 potvrzeny teprve nedávno. Dendritické buňky po infekci virem západonilské horečky produkovaly IFN $\beta$  i přes delecii v genech pro IRF-3 a IRF-7. Klíčovou roli v signalizaci přes cytosolické receptory, hraje signální adaptor IPS-1, kotvený na mitochondriální membráně, ale detail interakce s IRF-5 zůstává neznámý (Lazear et al. 2013, Li et al. 2011).

TLR7, TLR8 a TLR9 se díky adaptorové molekule MyD88 účastní aktivace IRF-5 v plasmacytoidních dendritických buňkách. Při signalizaci přes TLR7 a MyD88 se aktivují kinázy IRAK1/4, přenášejí signální aktivaci na TRAF6 a ten ubiquitínuje IRF-5 (Obrázek 3.2.). IRF-5 je fosforylován především kinázami TBK1 a IKK $\epsilon$  a dochází k dimerizaci (Takaoka et al. 2005, Schoenemeyer et al. 2005, Balkhi et al. 2008).



Obrázek 3.2. Znáznornění signální transdukce při aktivaci IRF-5. Zkratka Ub značí ubiquitinaci, P je fosforylace a Ac je acetylační modifikace. Zatímco fosforylace a ubiquitinace jsou prováděny v cytosolu, interakce s CBP/p300 a acetylace probíhá až v jádře. Promotor, na který komplex nasedá, může být pro IFN typu I i pro prozánětlivé cytokiny. Upraveno dle Cham et al. 2012.

Studie krystalové struktury C konce IRF-5 umožnila náhled do detailu dimerizace. Obecně platí, že fosforylace inhibiční domény změnil strukturní orientaci proteinu a odhalí domény potřebné k mezi proteinovým interakcím (Takahasi et al. 2003, Qin et al. 2005). U IRF-5 se inhibiční doména v aktivovaném monomeru oddálí od zbytku proteinu a ten tak zaujme prodlouženou konformaci. Zásadní vliv na destabilizaci inhibiční domény má fosforylace serinu 425. Fosforylace serinu 436 umožní vytvoření vodíkového můstku mezi modifikovanou aminokyselinou a argininem 328. Ten je konzervovaný i u IRF-3 a IRF-7, což umožňuje volnou kombinovatelnost IRF-3, IRF-5 a IRF-7 v heterodimerizaci. Roli v dimerizaci hrají hydrofobní i iontové interakce, které jsou díky unikátním, nekonzervovaným aminokyselinám silnější než u IRF-3 a IRF-7 (Chen et al. 2008a, Foreman et al. 2012).

### 3.4. Regulace

#### 3.4.1. Regulace buněčným aparátem

Regulace neaktivovaného stavu IRF-5 inhibiční doménou není tak nekompromisní, jako u IRF-3. Vysoká hladina IRF-5 není bez indukce přítomna ve většině buněčných typů, a proto protein nepotřebuje sám sebe tak striktně omezovat. Fosforylace inhibiční domény zvyšuje schopnost dimeru IRF-5 vázat CBP až 40 krát méně účinně než je tomu u IRF-3 dimeru (Barnes et al. 2002, Chen et al. 2008a, Chen et al. 2008b).

IRF-5 má roli v apoptóze buňky, ale na rozdíl od IRF-3, apoptózu nevyvolává při jakékoliv virové infekci. K vyvolání apoptózy pomocí IRF-5 dochází, pouze pokud je poškozena buněčná DNA. Samotný proapoptotický efekt a regulace buněčného růstu pomocí IRF-5 jsou nezávislé na přítomnosti p53 (Barnes et al. 2003a). Dříve zjištěná schopnost p53 vázat se na IRF-5 může podpořit signalizaci uplatňující se v apoptóze, ale není nezbytná (Mori et al. 2002).

Negativní vliv na IRF-5 má fosforylace zprostředkovaná kinázou IKK $\alpha$ , která inhibuje schopnost IRF-5 indukovat IFN typu I. Mechanismus inhibice spočívá v tom, že fosforylace specifická pro IKK $\alpha$  zabraňuje ubiquitinaci IRF-5 proteinem TRAF6. Jednotlivé aminokyseliny, které podléhají modifikaci ze strany IKK $\alpha$  nejsou dosud známy (Balkhi et al. 2010). Stejná skupina objevila také negativní regulaci IRF-5 alkalickou fosfatázou, enzymem odstraňujícím fosforylační modifikace z proteinů. IRF-5 jako transkripční faktor indukuje produkci alkalické fosfatázy a sám sebe udržuje pod negativním regulačním tlakem (Balkhi et al. 2010).

### **3.4.2. Regulace virovými proteiny**

Účinných antagonistů IRF-5 je v souboru virových proteinů mnohem méně než u IRF-3 a IRF-7. Důvody mohou být různé. Zprvu gen pro IRF-5 je exprimován v mnohem nižší míře než gen pro IRF-3 a zároveň, IRF-5 nemá tak rozsáhlou a komplexní funkci v indukci IFN typu I jako IRF-7. Dále hraje roli i fakt, že množství virových kmenů produkci IRF-5 v převážné většině tkání ani neindukuje (Mancl et al. 2005, Daffis et al. 2009).

Virový homolog IRF, vIRF-3, kódovaný herpesvirem HHV 8 váže svou centrální doménou IRF-5. Vazba zabraňuje IRF-5 nasedat na DNA a spouštět transkripci. Produkci vIRF-3 chrání virus maligní buňky před apoptózou, vyvolávanou IRF-5 (Wies et al. 2009).

Rotaviry (*Reoviridae*) kódují nestrukturní protein 1, který při infekci indukuje proteasomální degradaci širokého spektra proteinů hrajících roli v navození antivirového stavu. Typ degradovaných proteinů se mezi rotavirovými kmeny může lišit. Lidské rotaviry preferují vyvolání degradace IRF-5 a IRF-7, zatímco zvířecí kmen indukuje degradaci i IRF-3 (Arnold a Patton 2011).

Nedávno byla objevena nová funkce proteinu Vpx viru lidské imunodeficiency 2 (HIV-2; *Retroviridae*). Vpx fyzicky interaguje s IRF-5 a zabraňuje jeho transkripční aktivitě. Podle autorů studie, ale IRF-5 neomezuje replikaci HIV-2 a mechanismus vlivu interakce Vpx a IRF-5 na vrozenou imunitu zůstává neznámý (Cheng a Ratner 2014).

V rodině IRF jsou i faktory, které plní dosti odlišné funkce od indukce produkce IFN typu I. IRF-4 se angažuje v transformaci B lymfocytů při infekci virem Epstein-Barrové. Virus indukuje vazbu IRF-4 na promotor genu pro IRF-5 a dochází k inhibici exprese a snížení hladiny IRF-5 v buňce. Mechanismus poukazuje na fakt, že komplexní onkogenní viry, jako je virus Epstein-Barrové, se neomezují pouze na snížení produkce nebezpečných interferonů, ale snaží předcházet i IRF-5 vyvolávané apoptóze (Xu et al. 2011).

### 3.5. Funkce

IRF-5 nepochybně hraje podstatnou roli v produkci interferonu u člověka (Barnes et al. 2001) i u myšího modelu (Paun et al. 2008). Avšak podstatná většina nových studií preferuje výzkum vlivu IRF-5 na autoimunitní choroby, jako je systémový lupus erythematosus (Xu et al. 2013 rev.). Velké možnosti dává IRF-5 i variabilita jeho transkriptů. Mnohé z nich slouží jako negativní mutantní formy v maligních buňkách (Yang et al. 2009).

Dosavadní poznatky umožňují široký náhled na funkci IRF-5, který není tolik omezen na regulaci virových infekcí jako jeho partneři IRF-3 a IRF-7. Jde především o schopnost indukovat vznik prozánětlivých interleukinů a také vliv IRF-5 na diferenciaci některých typů buněk (Takaoka et al. 2005, Lien et al. 2010).

#### 3.5.1. Vazba na DNA

Krystalová struktura IRF-5, kterou analyzoval Chen et al. (2008b) zahrnovala pouze C konec proteinu. I u IRF-5 platí přítomnost konzervované tryptofanové pentády (Escalante et al. 1998) a rozeznávání sekvence 5'-AANNGAAA-3' (Fujii et al. 1999).

Sekvenčním srovnáním 120 aminokyselin na N konci proteinů IRF-3, IRF-7 a IRF-5 se dají odvodit vztahy aminokyselin smyčky 1 (L1) a alfa helixu 3 ( $\alpha 3$ ) a nukleotidů. Srovnání vychází z krystalové studie pro enhanceozóm na genu pro IFN $\beta$  (Panne et al. 2007).

Histidin 49, je konzervovaný i u IRF-3 a IRF-7 a dá se předpokládat, že histidiny sdílí preferenci pro AA dimer na 5' konci sekvence (5'-AANNGAAA-3'). Preferenci pro GAA určuje taktéž konzervovaný arginin 90 a cystein 91 v  $\alpha 3$  (5'-AANNGAAA-3'). Nekonzervované argininy u IRF-3, které omezují variabilitu vázané sekvence DNA, mají odpovídající aminokyseliny u IRF-5. Jde o leucin 95 a alanin 87, přičemž obě aminokyseliny preferují vazbu methylové skupiny T (Sousa et al. 2010 rev.), takže na dvou místech rozpoznávané sekvence bude T či komplementární A (5'-AANT/AGAAAT/A-3').

#### 3.5.2. Indukce interferonu $\beta$

Indukce IFN $\beta$  proteinem IRF-5 je pozorovatelná při virové infekci u myších buněk (Paun et al. 2008). Vliv homodimeru IRF-5 či heterodimeru s IRF-3 není zcela jasně definován. Studie, zaměřená na infekci myších plazmacytoidních dendritických buněk poxviry, poukázala na přítomnost IFN $\beta$  i u jedinců s delecí v *Irf3* genu (Dai et al. 2011). Jelikož se IRF-7 váže v pozitivně regulujících doménách *Ifnb* slabě (Wathelet et al. 1998), lze předpokládat, že za indukci stojí homodimer IRF-5.

Kooperace IRF-5 s ostatními proteiny vázajícími se k promotoru, hlavně s CBP/p300, se nijak podstatně neliší od promotoru, kde figuruje IRF-3 (Chen et al. 2008b). Výjimkou je acetylační modifikace IRF-5 a rekrutování histonových deacetyltransferáz na promotorový komplex (Feng et al. 2010).

### 3.5.3. Indukce interferonu $\alpha$

Už v prvních studiích, zkoumajících vliv IRF-5 na indukci IFN $\alpha$ , se vzorec produkovaných subtypů IFN lišil od vzorce subtypů indukovaných IRF-7. Zejména hladina mRNA *Ifna8* byla unikátně vysoká při infekci lidských buněk virem nemoci Newcastle (Newcastle disease virus; NDV) (Barnes et al. 2001). Stejná studie také poukázala na to, že schopnost IRF-5 být aktivován a indukovat IFN typu I, je specifická jen pro určité virové infekce. Tento fakt na několik dalších let vedl k pochybnostem o vztahu mezi virovou infekcí a indukcí IFN typu I.

Na rozdíl od dimeru IRF-3 a IRF-5, kde faktory spolupracují na indukci IFN $\alpha$  (Barnes et al. 2002), v dimeru IRF-5 a IRF-7 si faktory navzájem kryjí DNA vazebné domény. Tato dimerizace IRF-5 a IRF-7 závisí pouze na fosforylaci IRF-7 a negativní regulace tak může působit jako ochrana před bezdůvodnou indukcí IFN typu I (Barnes et al. 2003b). Po fosforylační a acetylační modifikaci se mění dynamika molekuly IRF-5 (Chen et al. 2008b). Protein je schopen vázat CBP/p300 i deacetyltransferázu, přijímat acetylační modifikaci a fungovat jako aktivátor IFN typu I (Obrázek 3.2.) (Feng et al. 2010).

Dvojaký model regulace IFN $\alpha$  přes IRF-5 v závislosti na jeho aktivitě dává smysl i v kontextu autoimunitních onemocnění. Jedním z patofyziologických projevů systémového lupus je abnormálně vysoká produkce IFN $\alpha$ . Právě některé izoformy IRF-5 jsou typicky spojené s výskytem nemoci (Cham et al. 2012 rev.). Zdá se tedy, že kratší formy IRF-5 (transitované ze sestřižených mRNA) nedokážou účinně potlačit produkci IFN $\alpha$  indukovanou IRF-7. Také bazální hladina IRF-5 v buňkách imunitního systému je vyšší než u ostatních tkání a stejně tak je tomu u IRF-7 (Su et al. 2004). Komplexní a klinicky významná interakce mezi IRF-5 a IRF-7 je tedy velice pravděpodobná.

## 4. Faktor 7 regulující interferon.

IRF-7 byl objeven v souvislosti s vazbou na ISRE promotoru Q viru Epstein-Barrové. Zhang a Pagano objevili gen, jehož převedená aminokyselinová sekvence vykazovala vysokou homologii s dosud známými IRF. Určili gen pro výchozí izoformu a další dva kratší produkty syntetizované ze sestřižených mRNA. Produkci majoritních izoforem lokalizovali do buněk sleziny a brzlíku a leukocytů periferní krve (Zhang a Pagano 1997). Později byl gen lokalizován do CpG bohaté oblasti na chromozomu 11p15.5 (Paris a Williams 2000).

### 4.1. Struktura

#### 4.1.1. Izoformy

Pomocí kvasinkového hybridního systému byly získány dvě cDNA proteinů, vázajících se na ISRE Q promotoru. Sekvenční analýza odhalila, že jde o izoformy jednoho proteinu. Byly určeny izoformy IRF-7A (délka 503 aminokyselin a velikost 69kDa) a IRF-7B s delecí 29 aminokyselin uvnitř proteinu (67kDa). Při srovnání sekvence nalezených izoforem s databází cDNA, našli IRF-7C, 164

aminokyselin dlouhý protein, zkrácený na C konci (23kDa). Svou sekvencí 151 aminokyselin na N konci je identický s IRF-7A a IRF-7B a posledních 13 aminokyselin je unikátních. Autoři stanovili pouze jednu kopii genu *Irf7*, takže izoformy B a C jsou translatovány z mRNA získaných alternativním sestřihem. Na experimentálních cDNA pro jednotlivé izoformy našli autoři také kryptické otevřené čtecí rámce pro alternativní proteiny, mimo jiné IRF-7C.2 nikdy nepotvrzený *in vivo* (Zhang a Pagano 1997). Hypotetický protein by neměl schopnost vázat DNA, ale stále by byl schopen interagovat s kinázou a mohl by sloužit jako kompetiční regulátor.

Srovnání DNA vazebné domény IRF-1 s databází odhalilo nového člena rodiny IRF. „Alignment“ jeho cDNA ho označil jako novou izoformu IRF-7, autory nazvanou IRF-7H (Au et al. 1998), občas také označovanou abecedně IRF-7D. IRF-7H je dlouhý 514 aminokyselin a vykazuje z rodiny IRF-7 největší homologii s IRF-3.

#### **4.1.2. Domény**

Protein IRF-7 obsahuje mnoho domén, důležitých pro jeho aktivaci, regulaci a funkčnost. Na N konci se nachází DNA vazebná doména (Zhang a Pagano 1997), která v rodině IRF proteinů vykazuje vysokou homologii a klíčový a typický je pro ni strukturní motiv „helix-turn-helix“, obsahující tryptofanovou pentádu (Escalante et al. 1998), vázající se u IRF-7 na sekvenci 5'-GAAWNYGAAANY-3' (Lin et al. 2000b). Daný motiv je variantou i sekvence 5'-AANNGAAA-3' obecně rozpoznávané faktory regulujícími interferon (Fujii et al. 1999).

Krystalová struktura celého IRF-7 nebyla získána a funkce a rozsahy strukturních domén byly prováděny analýzou delečních mutant, či na modelu jiných členů IRF. Oblast mezi aminokyselinami 471 až 487, bohatá na seriny, je významná z hlediska fosforylace při aktivaci IRF-7. Je součástí domény odpovídající na signál (signal responsible domain) v oblasti 468 až 503, která slouží jako přídavný region pro fosforylaci při aktivaci. Při delecích v oblasti 341 až 467 se tvořil neustále aktivní IRF-7. Tato oblast byla určena tedy jako inhibiční doména. Pro specifickou indukci, vyvolanou virovou infekcí je důležitá virem aktivovaná doména, jejíž posttranslační modifikace zvyšují virem indukovanou aktivitu IRF-7 (Lin et al. 2000a). Interakce mezi dvěma IRF-7 je v oblasti 300 až 514, doména zde je označována jako IRF asociační (IAD) a byla odvozena podle homologie s aminokyselinami asociační domény IRF-5 určené z krystalové studie struktury (Chen et al. 2008b).

Na N konci obsahuje IRF-7, jako jediný v rodině IRF, putativní PEST doménu (Sato et al. 2000). Tato na prolin, glutamovou kyselinu, serin a threonin bohatá sekvence přispívá jako jeden z faktorů ke krátkému poločasu života proteinů v buňce (Rechsteiner a Rogers 1996).

## **4.2. Posttranslační modifikace**

### **4.2.1. Fosforylace**

Už výše bylo zmíněno, že oblast 471 až 487 je bohatá na seriny. Jako první byly analýzou substitučních mutant určeny seriny 477 a 479 jako cílové aminokyseliny pro fosforylaci (Lin et al.

2000a). Později byla odhalena fosforylace serinů 483 a 484 jako důležitý prvek při aktivaci IRF-7 virovou infekcí (Au et al. 2001a).

Další analýzy odhalily, že mutace v serinech (471, 472, 483 a 487) způsobily neschopnost IRF-7 být aktivován kinázami, běžně aktivujícími nemutovaný IRF-7 (tenOever et al. 2004). tenOever et al. (2004) také ukázali, že nahrazení serinů 483 a 487 alaninem, neschopným přijmout fosforylační modifikaci, zcela eliminuje schopnost IRF-7 reagovat aktivací na virovou infekci. Nahrazením serinů fosfomimetickým aspartátem, vzniká neaktivní protein, ovšem stále schopný podléhat plné aktivaci kinázami při virové infekci (tenOever et al. 2004). Tento jev poukazuje na složitý vztah mezi jednotlivými fosforylovanými seriny a aktivitou IRF-7.

Fosforylace IRF-7 se účastní několik klíčových kináz buněčného i virového původu. Jako nejdůležitější z nich byly určeny kináza IKK $\epsilon$  a TBK1 (Sharma et al. 2003), které jsou součástí signální dráhy, vedoucí nejen k fosforylaci IRF-7. Specifičtější kinázou navrhnoutou pro možnou fosforylaci IRF-7 je IRAK1. Na myši s inaktivovaným genem *Irak-1* bylo ukázáno, že aktivace IRF-7 přes stimulovaný TLR9 v plasmacytoidních dendritických buňkách (plasmacytoid dendritic cell; pDC) nebyla možná i přesto, že hladina dalšího transkripčního faktoru, indukovaného dráhou přes TLR9, NF- $\kappa$ B, zůstala v normě (Uematsu et al. 2005). Mechanismus regulace kinázy IRAK1 spočívá v jeho aktivaci peptidyl-prolyl izomerázou, která je sama aktivována receptory TLR7 a TLR9 (Tun-Kyi et al. 2011). Další kinázou, která aktivuje IRF-7 především v pDC v dráze vycházející z TLR7 a TLR9 je kináza IKK $\alpha$  (Hoshino et al. 2006). Nově bylo zjištěno, že se aktivace IRF-7 a následné indukce IFN typu III, účastní také kinázy rodiny Src (Nousiainen et al. 2013).

#### **4.2.2. Ubiquitinace**

V obecném smyslu je ubiquitinace použita pro označení proteinů směřujících do proteazomu a určených k degradaci. Buňka se tímto mechanismem zbavuje poškozených, nedokonale syntetizovaných či dále nepotřebných proteinů. U pDC, které jsou hlavním producentem interferonu, se po setkání s infekcí a autokrinně vylučovaným interferonem oslabuje tato degradační dráha. Díky atenuaci degradace může IRF-7 transkripčně aktivovat více IFN, čímž vzniká pozitivní zpětná vazba (Prakash a Levy 2006).

Nové poznatky ovšem odhalily, že modifikace ubiquitinem hraje důležitou roli i v aktivaci IRF-7. Onkoprotein viru Epstein-Barrové, latentní membránový protein 1 (latent membrane protein 1; LMP1) vyvolává ubiquitinaci IRF-7 přes lysin 63 ubiquitinu. Modifikace nevede k degradaci, ale ke stabilizaci proteinu a jeho další aktivitě (Huye et al. 2007). E3 ligazová aktivita proteinu TRAF6, který je součástí signalizační dráhy toll-like receptorů, vede k polyubiquitinaci na lysinech (444, 446 a 452) C konce IRF-7. Navíc tato modifikace nejeví závislost na fosforylaci aktivních míst a vede k domněnce, že ubiquitinace IRF-7 je nutným předpokladem jeho fosforylace (Ning et al. 2008).

#### **4.2.3. Sumoylace**

Modifikace pomocí ubiquitinu podobných modifikátorů (small ubiquitin-related modifiers; SUMO) není u IRF-7 zcela prozkoumána a většina experimentální práce byla provedena na myším modelu.



Modifikace byla detekována na lysinu 406 u myšího IRF-7, který odpovídá lysinu 452 u IRF-7 člověka, kde dochází k ubiquitinaci. Na rozdíl od ubiquitinace je sumoylace v tomto případě negativním regulátorem a pravděpodobně slouží k oslabení produkce IFN během virové infekce i po jejím ukončení (Kubota et al. 2008). Později byla prokázána sumoylace na lysinech 444 a 446, kde dochází také k ubiquitinaci. Modifikace spolu kompetují a určují aktivitu IRF-7. Jako negativní regulátor je sumoylační modifikace využívána také virem Epstein-Barrové. Modifikaci na lysinu 452 provádějí buněčné enzymy, které jsou však indukovány virovým LMP1. Zvyšuje se zadržování IRF-7 v jádře a snižuje se jeho aktivita (Bentz et al. 2012).

#### 4.2.4. Acetylce

Tato modifikace lysinu byla nalezena v oblasti DBD, kde se navázáním kyselé skupiny zhorší schopnost IRF-7 vázat se na DNA sekvenci. Při *in vivo* infekci byla prokázána acetylce na konzervovaném lysinu 92 pomocí faktoru asociovaného s komplexem CBP/p300 (Caillaud et al. 2002).

### 4.3. Aktivace

IRF-7 je konstitutivně produkován ve velice nízké míře v buňkách lymfoidního původu. Ve většině tkání se může jeho hladina zvýšit po indukci interferonem. Patogeny a jejich komponenty jsou detekovány pomocí receptorů rozeznávajících vzorce (PRR) na membráně či v cytosolu, v závislosti na svém molekulárním vzorci. Z důvodu komplexní funkce IRF-7 v aktivaci vrozené imunity, je soubor receptorů a jejich adaptorů široký. Jednotlivé PRR mohou být svou schopností aktivovat IRF-7 buněčně specifické nebo podléhají jen určitým molekulárním vzorcům jednotlivých patogenů (Akira et al. 2006 rev.).

IRF-7 je v cytoplazmě syntetizován v neaktivní formě udržované inhibiční doménou, (Lin et al. 2000a). Posttranslační modifikace mají vliv na rozvolnění jeho struktury a uvolnění hydrofobního povrchu IAD umožňujícího dimerizaci (Chen et al. 2008b).

Mezi cytosolické PRR zapojené do aktivace IRF-7 patří RIG-I a MDA5 (Kato et al. 2006). Oba receptory rozeznávají RNA vznikající v replikačním cyklu mnoha virů a přes adaptorový protein IPS-1 aktivují kinázy TBK1 a IKK $\epsilon$  (Sharma et al. 2003).

Potenciálně patogenní DNA v cytosolu registruje aktivátor IRF závislý na DNA (Takaoka et al. 2007). Přítomnost receptoru DNA byla předpovězena díky schopnosti buněk, transfekovaných syntetickou DNA, indukovat IFN nezávisle na toll-like signalizací (Ishii et al. 2006).

Signalizace přes membránové toll-like receptory může vést k aktivaci IRF-7 dvěma různými cestami. První z nich využívá adaptorový protein TRIF a zahrnuje TLR4 na vnější membráně a endozomální TLR3, oba jsou schopny rozeznávat dsRNA (Honda et al. 2006). I když tato signalizace vede k primární aktivaci IRF-3 a NF $\kappa$ B, je signalační kaskáda vedoucí přes adaptor TRIF schopna aktivovat i IRF-7 (Génin et al. 2009a). Druhým adaptorem na toll-like receptorech je MyD88, se

kterým IRF-7 fyzicky interaguje (Honda et al. 2004). MyD88 dependentní dráha je většinou využívána při aktivaci IRF-7 a je nezbytná pro správnou produkci IFN $\alpha$ , jak prokázaly pokusy s *Irf7*<sup>-/-</sup> myši (Honda et al. 2005).

MyD88 je využíván při signalizaci přes endozomální TLR7/8 a TLR9 a přes membránový TLR2. TLR7/8 rozeznává ssRNA a TLR9 nemethylované CpG motivy DNA (Akira et al. 2006 rev.). Při signální transdukci se uplatňují kinázy IRAK1 a IRAK4 (Uematsu et al. 2005, Kim et al. 2007) a aktivují TRAF6 (Honda et al. 2004). Kinázová kaskáda pokračuje na kinázu IKK $\alpha$ , nezbytnou pro aktivaci IRF-7 při signalizaci přes TLR7/8 a TLR9 (Hoshino et al. 2006).

Důležitou roli v regulaci aktivace také hraje dráha fosfatidylinozitol 3-kinázy, která působí na jadernou translokaci IRF-7 aktivovaného přes TLR7 a 9, či RIG-I receptor (Guiducci et al. 2008, Hrncius et al. 2011). Savčí cíl rapamycinu z této dráhy a jeho serin/threonin kinázová aktivita se také uplatňuje ve vazbě IRF-7 a MyD88 (Schmitz et al. 2008).

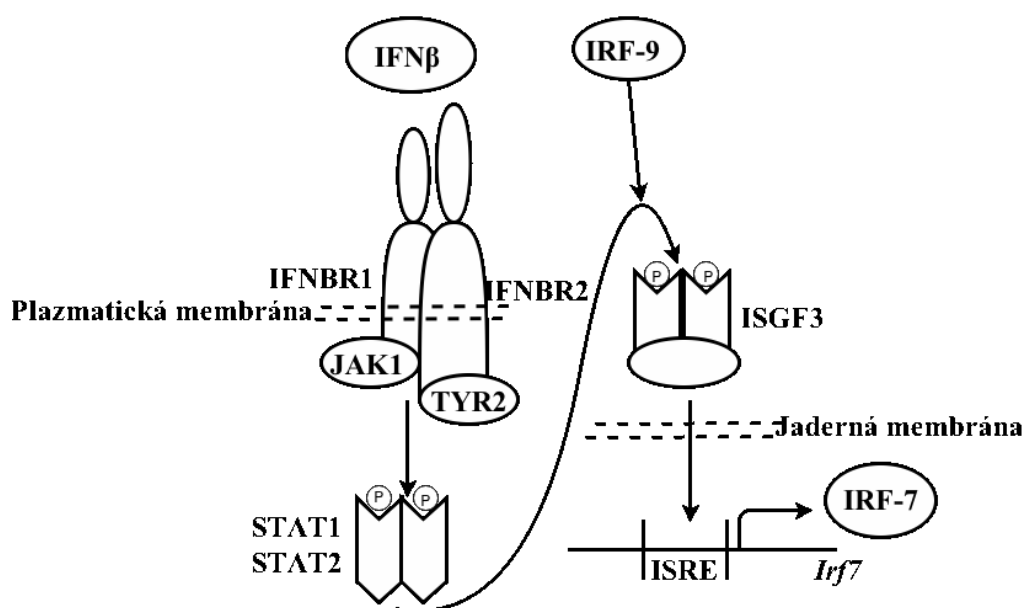
Po aktivaci vytváří IRF-7 homodimery či heterodimery, popřípadě interaguje s jinými molekulami zahrnutými v signální dráze, obnažuje svou DNA vazebnou doménu a vcestuje do jádra (Marié et al. 2000).

## 4.4. Regulace

### 4.4.1. Regulace buněčným aparátem

Jako důležitý faktor v organizaci vrozené imunity, podléhá IRF-7 komplexní regulaci. Na *Irf7*<sup>-/-</sup> myši bylo prokázáno, že udržovaná bazální hladina IRF-7 v pDC je nezbytná pro zvýšení hladiny IFN typu I. Poměr vznikajících homo- a heterodimerů IRF je důležitým faktorem pro určení vzorce vznikajících cytokinů. Tento poznatek určil IRF-7 jako hlavní regulátor indukce IFN typu I (Honda et al. 2005).

Regulace exprese IRF-7 je podmíněna pozitivní zpětnou vazbou IFN $\beta$ . Ten spouští interakci s buněčnými receptory dráhu Janusovy kinázy. Fosforylované aktivátory transkripce tvoří komplex ISGF3, ve kterém je obsažen také IRF-9, který zde slouží jako DNA vazebná komponenta. ISGF3 se váže na promotory genů stimulovaných interferonem (obsahujících ISRE), mezi které patří i *Irf7*. Následně zvýšená produkce IRF-7 usnadní a posílí jím zprostředkovanou indukci IFN- $\alpha$  (Marié et al. 1998, Sato et al. 1998) (Obrázek 4.1.).



Obrázek 4.1. Schéma mechanismu, jakým IFN $\beta$  indukuje produkci IRF-7, který se dále uplatňuje v indukci interferonu. Interferon tak tvoří pozitivně regulující zpětnou vazbu. IFNBR značí receptory IFN $\beta$ , JAK a TYR2 jsou kinázy uplatňující se ve fosforylaci STAT proteinů. Komplex STAT1/2 a IRF-9 tvoří ISGF3, který vcestuje do jádra a indukuje tvorbu IRF-7.

Gen pro IRF-7 je v kondenzované části chromozomu a za normálních podmínek nepřístupný transkripčním faktorům. Inhibitory topoizomerázy II, umožňující rozvolnění struktury, čímž pozitivně regulují expresi *Irf7* (Lu et al. 2002). Gen pro IRF-7 obsahuje v promotorové oblasti IRF vazebný element a v prvním intronu element odpovídající na interferonovou stimulaci (ISRE). Oba elementy umožňují jeho základní aktivaci, vyvolanou interferonem či virovou infekcí. Při experimentu s infekcí Sendai virem se formuje komplex IRF-7, CBP a p300, který se váže na oba zmiňované elementy genu *Irf7*, čímž je IRF-7 autoregulován nezávisle na IFN signalizaci (Ning et al. 2005).

Pochody buňky, které mohou případně vyústit v její smrt, jsou obvykle regulovány na více úrovních. Transkripční regulace IRF-7 je primární, existuje ale i regulace na translační úrovni. Myš s deletovanými geny pro represory vázající iniciátory translace je resistantní k infekci virem vesikulární stomatitidy a je u ní zvýšená hladina mRNA pro IRF-7 a indukovaného IFN typu I (Colina et al. 2008).

Další úroveň regulace je poločas rozpadu proteinu IRF-7 v buňce. V neinfikované buňce je IRF-7 stabilní cca 5 hodin, po infekci je ve většině buněk pomocí proteasomální degradace snížena životnost na 0,5 až 1 hodinu (Prakash a Levy 2006). Za degradaci IRF-7 odpovídá pro něj specifická a mezi organizmy konzervovaná PEST doména (Sato et al. 2000). Ke snížení stability proteinu přispívá také jeho aktivace, tedy fosforylace. Zvýšená degradace má za úkol snížit postinfekční produkci IFN typu I. Tento jev se ovšem odlišuje v případě pDC, thymocytů a splenocytů, kde naopak po infekci je

degradační dráha atenuována. Oslabení degradace je částečně ovlivněno autokrinním IFN a částečně je na IFN nezávislé. Protein potom zůstává aktivní i více než 24h (Prakash a Levy 2006).

I RNA interference může hrát roli v rychlém odstranění IRF-7 z buňky; siRNA zaměřená proti mRNA IRF-7, způsobila, že následně nebylo možné detekovat protein (Génin et al. 2009a).

#### 4.4.2. Regulace virovými proteiny

Je v zájmu viru, aby jeho infekce byla úspěšná, proto viry vyvinuly mnoho unikátních způsobů, jak překonávat obranné mechanismy organismu a spouštět svou replikaci. O důležitosti IRF-7 a jeho nebezpečnosti pro virus svědčí fakt, že mnoho virů produkuje či obsahuje proteiny schopné přímo či nepřímo interagovat s IRF-7 a omezením produkce IFN usnadnit svou replikaci.

Při latentní infekci virem Epstein-Barrové funguje několik regulačních okruhů, většina z nich se protíná v proteinu LMP1. Uvedený onkoprotein je nejen schopen vyvolávat fosforylaci IRF-7, ale také pozitivně reguluje jeho expresi přes aktivaci NF $\kappa$ B, který se váže na promotor *Ifr7* (Zhang et al. 2001). IRF-7 je poté schopen nasedat na ISRE v promotoru genu pro LMP1 a indukovat jeho expresi, a to s 10% účinností s jakou indukuje expresi nejsilnější transkripční aktivátor virového původu (Ning et al. 2003).

Člen čeledi *Paramyxoviridae*, lidský parainfluenza virus typu 2, využívá svůj protein V na signalizační dráze toll-like receptorů 7 a 9. Interakce probíhá s celou řadou proteinů v této dráze, jako jsou IRF-7, TRAF6, MyD88 a IKK $\alpha$ . Klíčová je vazba na TRAF6 přes motiv bohatý na tryptofan a inhibice pozitivní polyubiquitinační modifikace IRF-7 (Kitagawa et al. 2013)

Virus spalniček (*Paramyxoviridae*) využívá proteinu V k obcházení produkce IFN v pDC, indukované přes toll-like receptory 7 a 9 s adaptorem MyD88. Protein V soutěží svou unikátní doménou na C konci s IRF-7 o vazbu na kinázu IKK $\alpha$ . Fosforylovaný protein V se poté stejnou doménou váže na IRF-7 a inhibuje ho (Pfaller a Conzelmann 2008). Také protein ORF45 omezuje IRF-7 tím, že s ním soutěží o kinázy. ORF45 je kódovaný virem HHV 8 (*Herpesviridae*) a blokuje fosforylaci IRF-7 tím, že sám slouží jako substrát pro kinázy IKK $\epsilon$  a TBK1 (Liang et al. 2012).

ML protein Thogoto viru (*Orthomyxoviridae*) je schopen vlastní interakcí zabránit dimerizaci IRF-7 a také brání jeho interakci s koaktivátorem TRAF6. Import IRF-7 do jádra ovšem není proteinem ML ovlivněn (Buettner et al. 2010).

Rotaviry (*Reoviridae*) kódují nestrukturní protein 1, který je svým C koncem schopen interagovat s IRF-7 a indukovat jeho proteasomální degradaci. Díky zmaření IFN odpovědi likvidací IRF-7 se rotavirus dokáže replikovat i v pDC a makrofágách, jinak profesionálních producentů IFN a díky nim prostupovat přes primární bariéru zažívacího traktu (Barro a Patton 2007). Enterovirus 71 (*Picornaviridae*) zasahuje do aktivity IRF-7 svým proteinem 3C. Tento virový protein je schopen unikátně štěpit IRF-7 mezi aminokyselinami glutamin 189 a serin 190 (Lei et al. 2013).

Kofaktor RNA-polymerázy, VP35, virů Ebola a Marburg (*Filoviridae*) využívá posttranslační modifikaci. Gen pro VP35 filoviru byl začleněn do myších dendritických buněk. Po infekci virem nemoci Newcastle (NDV) bylo pozorováno rapidní snížení hladiny produkovaného IFN. VP35

interaguje s buněčnými SUMO ligázami a zvyšuje jejich aktivitu, přičemž sumoylační modifikace na IRF-7 mají negativní vliv (Chang et al. 2009). Účinnost tohoto mechanismu byla později omezena zjištěním, že buňky plazmacytoidního charakteru jsou schopny tuto inhibici obcházet (Leung et al. 2011).

HHV 8, herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem kóduje hned několik proteinů ovlivňujících IRF-7 na více úrovních. Protein ORF50 patří ke skupině proteinů angažujících se ihned po infekci a je schopen svou E3 ligázovou aktivitou zprostředkovat proteasomální degradaci IRF-7. Kotransfekce ORF50 snižuje hladinu mRNA pro IFN $\alpha$  a IFN $\beta$  v buňce (Yu et al. 2005). Homolog buněčných IRF, vIRF-3, svou centrální částí váže DNA vazebnou doménu nebo IRF asociační doménu proteinu IRF-7. Samotná interakce zabraňuje vazbě IRF-7 na DNA a postačuje k snížení produkce IFN $\alpha$  (Joo et al. 2007).

Virus Epstein-Barrové (*Herpesviridae*) stál u objevu IRF-7. Tento onkogenní virus si ochočil mechanismy, kterými dokáže regulovat IRF-7 při akutní infekci i při navození latence a své reaktivaci. Negativně regulující funkce tegumentového proteinu LF2 spočívá v jeho interakci s IAD IRF-7 a zabránění jeho dimerizaci (Wu et al. 2009).

## 4.5. Funkce

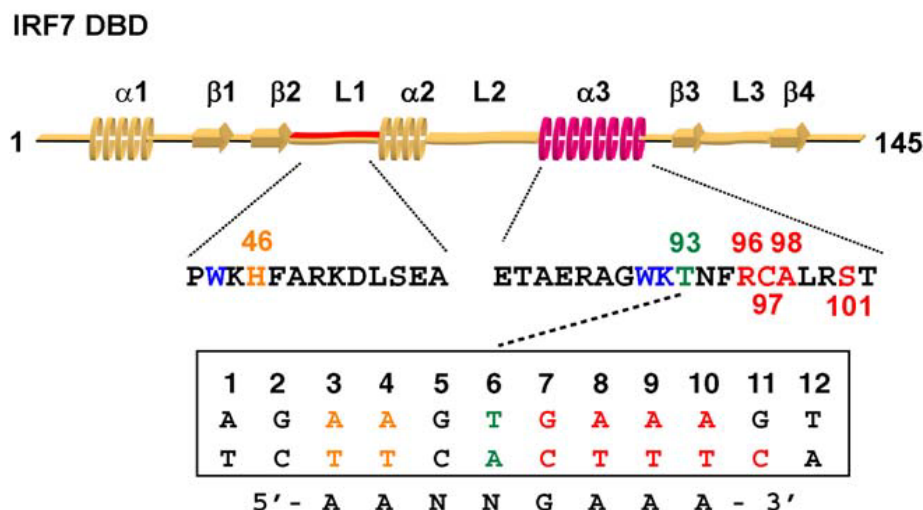
IRF-7 je jeden ze tří členů rodiny faktorů regulujících interferon, který je kriticky důležitým prostředníkem mezi detekcí virové infekce a indukcí IFN typu I. Mezi IFN typu I řadíme IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\tau$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\nu$  a  $\omega$ . Majoritní vliv pro navození antivirového stavu v buňce mají IFN $\alpha$  a IFN $\beta$ , na nichž bylo provedeno nejvíce výzkumů spojených s indukcí pomocí IRFs. Zatímco *Ifnb* je pouze jediný gen, *Ifna* je u člověka kódován 13 subtypy genu (Diaz et al. 1995), které se vyskytují na chromozomu v jediném klastru v těsné blízkosti *Ifnb*. Jednotlivé subtypy vznikly v evoluci genovou konverzí i genovou duplikací (Woelk et al. 2007). Protein IFN $\alpha$  existuje ve 12 subtypech, ale genů je u člověka přítomno 13. *Ifna13* a *Ifna1* slouží oba jako gen pro IFN $\alpha 1$  (Mogensen et al. 1999). Právě vzorec exprese jednotlivých subtypů IFN $\alpha$  je jedním z nejdůležitějších funkčních mechanismů zprostředkovaných IRF-7.

### 4.5.1. Vazba na DNA

DNA vazebnou roli hrají DBD jednotlivých IRFs, které rozeznávají konzervované 5'-AANNGAAA-3' repetice v promotorech s různou úspěšností. Detail této vazby byl určen studií atomového modelu *Ifnb* enhanceozómu a krystalových struktur DBD IRF. Největší roli pro rozeznání správné sekvence hrají určité aminokyseliny v helixu  $\alpha 3$  a smyčce L1 DNA vazebné domény.

Arginin 96 a cystein 97 (obě v helixu  $\alpha 3$ ) určují svou specifitou G (vodíková vazba s argininem 96) a AA dinukleotid za G směrem k 3' konci (5'-AANNGAAA-3'). Histidin 46 (smyčka L1) určuje AA dinukleotid v 5'směru od GAAA úseku (5'-AANNGAAA-3'). Poslední A na 3'konci rozpoznávané sekvence (5'-AANNGAAA-3') je určeno svou komplementární bází T, jehož

methylová skupina nepolárně váže alanin 98 ( $\alpha 3$ ). Volnější vazba IRF-7 DBD je umožněna tolerancí G 5' směrem od sekvence (5'-GAAANGAAA-3'), díky alaninu 48 (L1). Další vliv má threonin 93 ( $\alpha 3$ ), který nevyžaduje dvě vodíkové vazby z GG dinukleotidu (5'-AANGAAA-3') a navíc svou methylovou skupinou tvoří van der Waalsovu vazbu s T uprostřed rozpoznávané sekvence (5'-AANTGAAA-3'), čímž udává sekvenční preferenci pro vazbu IRF-7 (Panne et al. 2007, De Ioannes et al. 2011, Morin et al. 2002) (Obrázek 4.2.).



Obrázek 4.2. Schematický detail terciální struktury DBD IRF-7. Pozice aminokyselin v alfa helixu 3 ( $\alpha 3$ ) a smyčce 1 (L1) jsou číslovány. Barva nukleotidů a aminokyselin odpovídá vzájemné interakci. Upraveno dle Génin et al. (2009b rev.)

#### 4.5.2. Indukce interferonu $\beta$

IRF-7 v kombinaci s dalšími členy IRF tvoří společně s komplexem CBP/p300 faktor aktivovaný virem (Wathelet et al. 1998). Ten se váže na pozitivně regulující domény I a III (PRD-I a PRD-III) v elementu odpovídajícím na přítomnost viru promotoru *Ifnb*. Vazba je ale velice slabá. Heterodimer IRF-3/IRF-7 interaguje s komplexem CBP/p300 na jeho N konci ve čtyřech odlišných oblastech (Yang et al. 2003). Na PRD-I doménu se může vázat také IRF-1 a napomáhat indukci (Fujita et al. 1989), ale není nezbytný (Reis et al. 1994). Roli v zesílení této vazby hrají další transkripční faktory a proteiny s regulační funkcí. Jelikož IRF-7 figuruje v enhanceozómu *Ifnb* v heterodimeru s IRF-3, je sled dějů, vedoucích až k aktivaci RNA polymerázy II, stejný jako v případě IRF-3 homodimeru.

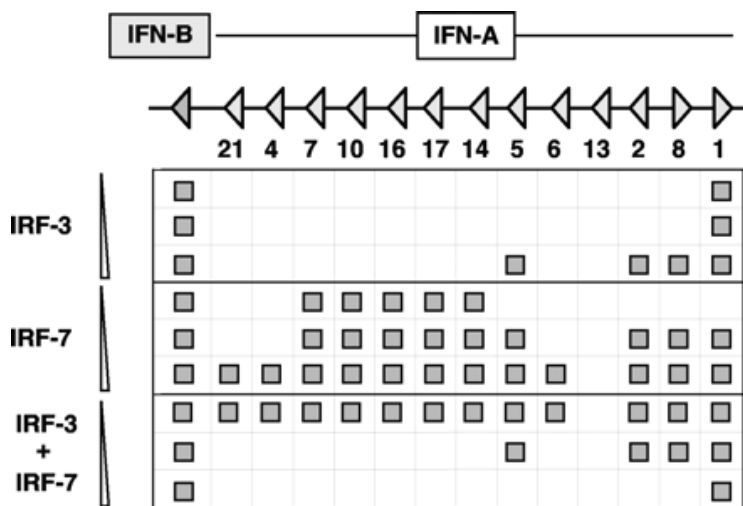
#### 4.5.3. Indukce interferonu $\alpha$

Sekvence v doménách B a D, potažmo C, umístěných v oblasti -98 až -45 před genem pro IFN $\alpha$ , obsahují různé varianty repetice 5'-AANGAAA-3'. Element odpovídající na přítomnost viru u *Ifna* obsahuje tři zmiňované domény, z čehož doménu C mají pouze *Ifna1* a *Ifna13*. B doména váže IRF-3 i IRF-7, C doména váže preferenčně IRF-3 a D doména váže IRF-3 i IRF-7 (u *Ifna1* a *Ifna13*). Substituce G za A v oblasti -52 před genem u ostatních *Ifna* subtypů způsobuje preferenci IRF-7 (Génin et al. 2009a). Je pravděpodobné, že tato jednonukleotidová substituce je příčinou exprese širokého spektra *Ifna* subtypů díky přítomnosti IRF-7.

Génin et al. (2009a) ve své studii ukázali celý vývoj zastoupení jednotlivých *Ifna* subtypů po infekci lymfoidních buněk Sendai virem. Infekce Sendai virem je signalizuje přes receptor RIG-I (Yoneyama et al. 2004) a jeho dráhou aktivuje IRF-3 i IRF-7. Kopie mRNA jednotlivých faktorů byly detekovány RT-qPCR v postupujících časech po infekci. Subtypy *Ifna1*, *Ifna2* a *Ifna5* dosahovaly prvního vrcholu 2 hodiny po infekci (h.p.i.) a druhého, vyššího vrcholu 8 h.p.i. V pozdějším experimentu prokázali, že tyto subtypy jsou při zvýšené expresi IRF-3, indukovatelné pouze tímto faktorem. V čase 8 h.p.i. dosahuje vrcholu hladina *Ifna10*, *Ifna8*, *Ifna17*, *Ifna16* a *Ifna14*, indukovaných zvyšujícím se poměrem IRF-7 ku IRF-3. Poslední, zřetelně oddělená skupina subtypů, kulminuje svou hladinou 12 h.p.i. a patří sem *Ifna21* a *Ifna7*. Subtyp *Ifna4* má 12 h.p.i. téměř nezaznamatelnou produkci a mRNA pro *Ifna6* nebyla detekována vůbec (Génin et al. 2009a).

Sledovaný poměr mRNA pro IRF-3 a IRF-7 byl 1:1 v čase 2 h.p.i. Avšak zatímco zvednutá hladina mRNA pro IRF-3 dále už jen klesala, hladina mRNA pro IRF-7 se zvedala, až na poměr 1:6 v čase 8 h.p.i., kdy se tvoří právě nejvíce subtypů *Ifna*. Zajímavé je, že v době kulminující hladiny mRNA pro IRF-7 se protein IRF-7 už téměř nedal detekovat, pravděpodobně díky nízkému poločasu života.

I přes preferenci určitého IRF (danou variantou konsenzus sekvence), může při nadměrné expresi faktoru dojít k vazbě v doménách preferující jiný IRF. IRF-7 je při nízké hladině na začátku infekce schopen indukovat *Ifna7*, *Ifna10*, *Ifna16*, *Ifna17*, *Ifna14* a při zvyšující se hladině začne indukovat téměř všechny subtypy *Ifna* (Obrázek 4.3.).



Obrázek 4.3. Se vzrůstající koncentrací mRNA pro IRF-3, IRF-7 a obou zároveň se mění vzorec produkovaných mRNA subtypů *Ifna*. Detekce mRNA subtypu *Ifna* je označena přítomností šedé značky. Je vidět, že vzrůstající koncentrace IRF-3 bez IRF-7 dokáže vyvolat indukci normálně neindukovaných subtypů. Naopak s rostoucí koncentrací obou faktorů se indukce omezuje jen na subtyp *Ifna1*. Převzato od Génin et al. (2009a).

Synergismus IRF-3 a IRF-7 byl prokázán při transfekci buněk exprimujících TLR3 plasmidem nesoucím gen pro IRF-7 a gen pro koaktivátor IRF, TRAF3. Buňky, následně infikované Sendai virem, vykazovaly, díky expresi z konstruktu, poměr IRF-7 ku IRF-3 15 až 30:1, což vedlo k

silné indukci všech *Ifna* subtypů, až na *Ifna21*, *Ifna6* a *Ifna4* (Génin et al. 2009a). Překvapující byla nízká hladina *Ifna21*, jelikož v buňkách bez transfekce, vykazovala 12 h.p.i. relativně vysokou hodnotu. Je pravděpodobné, že zde dochází k jemnějším regulačním mechanismům, než je pouhý poměr regulačních faktorů. Víme, že B a D domény *Ifna21* a *Ifna4* vykazují silnou homologii s doménami *Ifna* subtypů silně indukovaných IRF-7 (Génin et al. 2009a). Regulačním mechanismem může být struktura chromozomu, kdy prostorová orientace DNA a kondenzace chromatinu brání efektivní transkripci (Fraser a Bickmore 2007). Je možné, že v klastru genů pro subtypy IFN $\alpha$ , jsou právě některé z nich takto handicapovány.

U buněk lymfoidního původu s konstitutivní expresí IRF-7 se po setkání s infekcí rapidně zvedá hladina tohoto faktoru a dochází k jevu zvýšení hladiny mRNA *Ifna1* na úkor ostatních subtypů (Izaguirre et al. 2003). Právě relativně vysoká hladina IRF-7 může způsobit jeho navázání se na nepreferovanou C doménu. Důvodem zesílení transkripce *Ifna1* může být obsazení a pozitivní regulace tří domén oproti dvěma u ostatních subtypů. Tento fakt a zároveň skutečnost, že produkt mRNA *Ifna1*, IFN $\alpha$ 1 je kódován i genem *Ifna13* (taktéž s doménou C), vedou k domněnce, že IFN $\alpha$ 1 je důležitým subtypem při navození antivirového stavu.

Regulace transkripce jednotlivých *Ifna* subtypů může být omezena i přítomností vzdálených negativně regulujících elementů před začátkem transkripce, objevených na myším modelu u *Ifna11* (Roffet et al. 1996).



## 5. Závěr

Rodina faktorů regulujících interferon je nepostradatelná v organizaci imunity a nastolení antivirového stavu. V této práci jsou shrnuty znalosti o funkci, aktivaci i regulaci tří členů rodiny IRF, kteří přímo reagují na virovou infekci produkcí IFN. Důraz je kladen zejména na rozdílný vliv jednotlivých IRF na indukci interferonu. Z rešerše vyplývá nezbytnost funkčních IRF pro imunitu a také jejich vliv na replikaci virů. Z toho, že virus ve svém rozsahově omezeném genomu kóduje proteiny za účelem omezit funkci IRF, můžeme usuzovat na význam těchto faktorů v potlačování infekce. Na mnoha příkladech z celého spektra virových kmenů je patrný aktivní boj virů proti IRF.

O IRF-3 je dnes již mnohé známo. Protein udržuje vysoké hladiny ve většině tkání a nejrychleji reaguje na infekci, primárně produkcí IFN $\beta$ . V další vlně interferonové produkce úzce spolupracuje s IRF-7 na rozlišení produkce třinácti subtypů IFN $\alpha$ .

U IRF-5 se vliv na produkci IFN shrnuje hůře. Mnoho nedávných experimentů se zaměřuje především na produkci prozánětlivých cytokinů. V současnosti je na IRF-5 kladen obrovský důraz hlavně v souvislosti s autoimunitními onemocněními, jako je systémový lupus erythematoses. Právě objev možnosti, jak medikamenty mírnit systémový lupus, žene výzkum IRF-5 kupředu.

U IRF-7 se podařilo určit jeho majoritní roli v diferenciaci produkce subtypů IFN $\alpha$ . Samotný IRF-7 využívá interakcí s IRF-3 i IRF-5 na koordinaci indukce. V budoucích výzkumech by bylo dobré se zaměřit i jiným směrem než je produkce IFN. Například vliv IRF-7 na apoptózu a onkogenezi by mohl být cílem dalšího bádání.

Pro pochopení mechanismu indukce odlišného vzorce IFN subtypů, je potřeba dalších studií na srovnání s těmi současnými. Prospěšný by byl experiment, který by odhalil detailní vliv IRF-5 na indukci IFN $\alpha$  a kooperaci mezi IRF-5 a IRF-7. Další studie, které vytvoří integrální pohled na rodinu IRF ve fyziologii organismu, umožní specificky zaměřit budoucí terapie.

## 6. Literatura

- Agalioti, T., S. Lomvardas, B. Parekh, J. M. Yie, T. Maniatis, and D. Thanos. 2000. 'Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter', *Cell*, 103:667-78.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. 'Pathogen recognition and innate immunity', *Cell*, 124:783-801.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. 'Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3', *Nature*, 413:732-8.
- Anglero-Rodriguez, Y. I., P. Pantoja, and C. A. Sariol. 2014. 'Dengue Virus Subverts the Interferon Induction Pathway via NS2B/3 Protease-I kappa B Kinase e Interaction', *Clinical and Vaccine Immunology*, 21:29-38.
- Arnold, M. M., and J. T. Patton. 2011. 'Diversity of Interferon Antagonist Activities Mediated by NSP1 Proteins of Different Rotavirus Strains', *Journal of Virology*, 85:1970-9.
- Au, W. C., P. A. Moore, D. W. LaFleur, B. Tombal, and P. M. Pitha. 1998. 'Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes', *Journal of Biological Chemistry*, 273:29210-7.
- Au, W. C., P. A. Moore, W. Lowther, Y. T. Juang, and P. M. Pitha. 1995. 'Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:11657-61.
- Au, W. C., W. S. Yeow, and P. M. Pitha. 2001. 'Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3', *Virology*, 280:273-82.
- Baccala, R., K. Hoebe, D. H. Kono, B. Beutler, and A. N. Theofilopoulos. 2007. 'TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity', *Nature Medicine*, 13:543-51.
- Balkhi, M. Y., K. A. Fitzgerald, and P. M. Pitha. 2008. 'Functional Regulation of MyD88-Activated Interferon Regulatory Factor 5 by K63-Linked Polyubiquitination', *Molecular and Cellular Biology*, 28:7296-308.
- Balkhi, M. Y., Fitzgerald, K. A. Pitha, P. M. 2010. 'IKK alpha negatively regulates IRF-5 function in a MyD88-TRAF6 pathway', *Cellular Signalling*, 22:117-27.
- Barnes, B. J., A. E. Field, and P. M. Pitha-Rowe. 2003b. 'Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes', *Journal of Biological Chemistry*, 278:16630-41.
- Barnes, B. J., M. J. Kellum, A. E. Field, and P. M. Pitha. 2002. 'Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes', *Molecular and Cellular Biology*, 22:5721-40.
- Barnes, B. J., M. J. Kellum, K. E. Pinder, J. A. Frisancho, and P. M. Pitha. 2003a. 'Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death', *Cancer Research*, 63:6424-31.
- Barnes, B. J., P. A. Moore, and P. M. Pitha. 2001. 'Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes', *Journal of Biological Chemistry*, 276:23382-90.
- Barro, M., and J. T. Patton. 2007. 'Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7', *Journal of Virology*, 81:4473-81.
- Bellingham, J., K. Gregory-Evans, and C. Y. Gregory-Evans. 1998. 'Mapping of human interferon regulatory factor 3 (IRF3) to chromosome 19q13.3-13.4 by an intragenic polymorphic marker',

- Annals of Human Genetics*, 62:231-4.
- Bentz, G. L., J. Shackelford, and J. S. Pagano. 2012. 'Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Regulates the Function of Interferon Regulatory Factor 7 by Inducing Its Sumoylation', *Journal of Virology*, 86:12251-61.
- Bibeau-Poirier, A., S. P. Gravel, J. F. Clement, S. Rolland, G. Rodier, P. Coulombe, J. Hiscott, N. Grandvaux, S. Meloche, and M. J. Servant. 2006. 'Involvement of the I kappa B kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation', *Journal of Immunology*, 177:5059-67.
- Buettner, N., C. Vogt, L. Martinez-Sobrido, F. Weber, Z. Waibler, and G. Kochs. 2010. 'Thogoto virus ML protein is a potent inhibitor of the interferon regulatory factor-7 transcription factor', *Journal of General Virology*, 91:220-7.
- Burns, V., and T. K. Kerppola. 2012. 'Opposite Orientations of a Transcription Factor Heterodimer Bind DNA Cooperatively with Interaction Partners but Have Different Effects on Interferon-beta Gene Transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 287:31833-44.
- Caillaud, A., A. Prakash, E. Smith, A. Masumi, A. G. Hovanessian, D. E. Levy, and I. Marie. 2002. 'Acetylation of interferon regulatory factor-7 by p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor (PCAF) impairs its DNA binding', *Journal of Biological Chemistry*, 277:49417-21.
- Cham, C. M., K. Ko, and T. B. Niewold. 2012. 'Interferon Regulatory Factor 5 in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus', *Clinical & Developmental Immunology*.
- Chang, T. H., T. Kubota, M. Matsuoka, S. Jones, S. B. Bradfute, M. Bray, and K. Ozato. 2009. 'Ebola Zaire Virus Blocks Type I Interferon Production by Exploiting the Host SUMO Modification Machinery', *Plos Pathogens*, 5.
- Chattopadhyay, S., J. T. Marques, M. Yamashita, K. L. Peters, K. Smith, A. Desai, B. R. G. Williams, and G. C. Sen. 2010. 'Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax', *Embo Journal*, 29:1762-73.
- Chen, W. J., H. Srinath, S. S. Lam, C. A. Schiffer, W. E. Royer, and K. Lin. 2008a. 'Contribution of Ser386 and Ser396 to activation of interferon regulatory factor 3', *Journal of Molecular Biology*, 379:251-60.
- Chen, W., S. S. Lam, H. Srinath, Z. Jiang, J. J. Correia, C. A. Schiffer, K. A. Fitzgerald, K. Lin, and W. E. Royer. 2008b. 'Insights into interferon regulatory factor activation from the crystal structure of dimeric IRF5', *Nature Structural & Molecular Biology*, 15:1213-20.
- Cheng, T. F., S. B. Rostek, O. Ando, S. Van Scoy, K. P. Kumar, and N. C. Reich. 2006. 'Differential activation of IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors during viral infection', *Journal of Immunology*, 176:7462-70.
- Cheng, X., and L. Ratner. 2014. 'HIV-2 Vpx Protein Interacts with Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) and Inhibits Its Function', *J Biol Chem*, 289:9146-57.
- Colina, R., M. Costa-Mattioli, R. J. O. Dowling, M. Jaramillo, L. H. Tai, C. J. Breitbach, Y. Martineau, O. Larsson, L. W. Rong, Y. V. Svitkin, A. P. Makrigiannis, J. C. Bell, and N. Sonenberg. 2008. 'Translational control of the innate immune response through IRF-7', *Nature*, 452:323-U2.
- Daffis, S., M. S. Suthar, K. J. Szretter, M. Gale, and M. S. Diamond. 2009. 'Induction of IFN-beta and the Innate Antiviral Response in Myeloid Cells Occurs through an IPS-1-Dependent Signal That Does Not Require IRF-3 and IRF-7', *Plos Pathogens*, 5.
- Dai, P. H., H. Cao, T. Merghoub, F. Avogadri, W. Y. Wang, T. Parikh, C. M. Fang, P. M. Pitha, K. A. Fitzgerald, M. M. Rahman, G. McFadden, X. Y. Hu, A. N. Houghton, S. Shuman, and L. Deng. 2011. 'Myxoma Virus Induces Type I Interferon Production in Murine Plasmacytoid Dendritic Cells via a TLR9/MyD88-, IRF5/IRF7-, and IFNAR-Dependent Pathway', *Journal*

- of Virology*, 85:10814-25.
- De Ioannes, P., C. R. Escalante, and A. K. Aggarwal. 2011. 'Structures of apo IRF-3 and IRF-7 DNA binding domains: effect of loop L1 on DNA binding', *Nucleic Acids Research*, 39:7300-7.
- Deddouche, S., D. Goubau, J. Rehwinkel, P. Chakravarty, S. Begum, P. V. Maillard, A. Borg, N. Matthews, Q. Feng, F. J. M. van Kuppeveld, and C. R. E. Sousa. 2014. 'Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells', *Elife*, 3.
- Diaz, M. O. 1995. 'The human type-i interferon gene-cluster', *Seminars in Virology*, 6:143-9.
- Doehle, B. P., K. Chang, A. Rustagi, J. McNevin, M. J. McElrath, and M. Gale. 2012. 'Vpu Mediates Depletion of Interferon Regulatory Factor 3 during HIV Infection by a Lysosome-Dependent Mechanism', *Journal of Virology*, 86:8367-74.
- Du, W., and T. Maniatis. 1992. 'An ATF/CREB binding-site protein is required for virus induction of the human interferon beta gene', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:2150-4.
- Escalante, C. R., E. Nistal-Villan, L. Y. Shen, A. Garcia-Sastre, and A. K. Aggarwal. 2007. 'Structure of IRF-3 bound to the PRDIII-I regulatory element of the human interferon-beta enhancer', *Molecular Cell*, 26:703-16.
- Escalante, C. R., J. M. Yie, D. Thanos, and A. K. Aggarwal. 1998. 'Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation', *Nature*, 391:103-6.
- Feng, D., N. Sangster-Guity, R. Stone, J. Korczeniewska, M. E. Mancl, P. Fitzgerald-Bocarsly, and B. J. Barnes. 2010. 'Differential Requirement of Histone Acetylase and Deacetylase Activities for IRF5-Mediated Proinflammatory Cytokine Expression', *Journal of Immunology*, 185:6003-12.
- Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao, and T. Maniatis. 2003. 'IKK epsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway', *Nature Immunology*, 4:491-6.
- Foreman, H. C. C., S. Van Scoy, T. F. Cheng, and N. C. Reich. 2012. 'Activation of Interferon Regulatory Factor 5 by Site Specific Phosphorylation', *Plos One*, 7.
- Fraser, P., and W. Bickmore. 2007. 'Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation', *Nature*, 447:413-7.
- Friedman, C. S., M. A. O'Donnell, D. Legarda-Addison, A. Ng, W. B. Cardenas, J. S. Yount, T. M. Moran, C. F. Basler, A. Komuro, C. M. Horvath, R. Xavier, and A. T. Ting. 2008. 'The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response', *Embo Reports*, 9:930-6.
- Fujii, Y., T. Shimizu, M. Kusumoto, Y. Kyogoku, T. Taniguchi, and T. Hakoshima. 1999. 'Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences', *Embo Journal*, 18:5028-41.
- Fujita, T., Y. Kimura, M. Miyamoto, E. L. Barsoumian, and T. Taniguchi. 1989. 'Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1', *Nature*, 337:270-2.
- Génin, P., R. T. Lin, J. Hiscott, and A. Civas. 2009a. 'Differential Regulation of Human Interferon A Gene Expression by Interferon Regulatory Factors 3 and 7', *Molecular and Cellular Biology*, 29:3435-50.
- Génin, P., A. Vaccaro, and A. Civas. 2009b. 'The role of differential expression of human interferon-A genes in antiviral immunity', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20:283-95.
- Gohda, J., T. Matsumura, and J. Inoue. 2004. 'Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling', *Journal of Immunology*, 173:2913-7.
- Grandvaux, N., M. J. Servant, B. tenOever, G. C. Sen, S. Balachandran, G. N. Barber, R. T. Lin, and J.

- Hiscott. 2002. 'Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: Direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes', *Journal of Virology*, 76:5532-9.
- Guiducci, C., C. Ghirelli, M. A. Marloie-Provost, T. Matray, R. L. Coffman, Y. J. Liu, F. J. Barrat, and V. Soumelis. 2008. 'PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation', *Journal of Experimental Medicine*, 205:315-22.
- Hayakawa, S., S. Shiratori, H. Yamato, T. Kameyama, C. Kitatsuji, F. Kashigi, S. Goto, S. Kameoka, D. Fujikura, T. Yamada, T. Mizutani, M. Kazumata, M. Sato, J. Tanaka, M. Asaka, Y. Ohba, T. Miyazaki, M. Imamura, and A. Takaoka. 2011. 'ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses', *Nature Immunology*, 12:37-U56.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda, and S. Akira. 2004. 'The roles of two I kappa B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection', *Journal of Experimental Medicine*, 199:1641-50.
- Heylbroeck, C., S. Balachandran, M. J. Servant, C. DeLuca, G. N. Barber, R. T. Lin, and J. Hiscott. 2000. 'The IRF-3 transcription factor mediates sendai virus-induced apoptosis', *Journal of Virology*, 74:3781-92.
- Higgs, R., J. N. Gabhann, N. Ben Larbi, E. P. Breen, K. A. Fitzgerald, and C. A. Jefferies. 2008. 'The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3', *Journal of Immunology*, 181:1780-6.
- Holm, G. H., J. Zurney, V. Tumilasci, S. Leveille, P. Danthi, J. Hiscott, B. Sherry, and T. S. Dermody. 2007. 'Retinoic acid-inducible gene-I and interferon-beta promoter stimulator-1 augment proapoptotic responses following mammalian reovirus infection via interferon regulatory factor-3', *Journal of Biological Chemistry*, 282:21953-61.
- Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi. 2006. 'Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors', *Immunity*, 25:349-60.
- Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh, and T. Taniguchi. 2004. 'Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:15416-21.
- Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi. 2005. 'IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses', *Nature*, 434:772-7.
- Hoshino, K., T. Sugiyama, M. Matsumoto, T. Tanaka, M. Saito, H. Hemmi, O. Ohara, S. Akira, and T. Kaisho. 2006. 'I kappa B kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9', *Nature*, 440:949-53.
- Hrincius, E. R., R. Dierkes, D. Anhlán, V. Wixler, S. Ludwig, and C. Ehrhardt. 2011. 'Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) is activated by influenza virus vRNA via the pathogen pattern receptor RIG-I to promote efficient type I interferon production', *Cellular Microbiology*, 13:1907-19.
- Hu, G. D., and B. J. Barnes. 2006. 'Interferon regulatory factor-5-regulated pathways as a target for colorectal cancer therapeutics', *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6:775-84.
- Huye, L. E., S. B. Ning, M. Kelliher, and J. S. Pagano. 2007. 'Interferon regulatory factor 7 is activated by a viral oncoprotein through RIP-dependent ubiquitination', *Molecular and Cellular Biology*, 27:2910-8.
- Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, S. Sato, M. Yamamoto, S. Uematsu, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2006.

- 'A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA', *Nature Immunology*, 7:40-8.
- Ishikawa, H., and G. N. Barber. 2008. 'STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling', *Nature*, 455:674-U74.
- Izaguirre, A., B. J. Barnes, S. Amrute, W. S. Yeow, N. Megjugorac, J. H. Dai, D. Feng, E. Chung, P. M. Pitha, and P. Fitzgerald-Bocarsly. 2003. 'Comparative analysis of IRF and IFN- $\alpha$  expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 74:1125-38.
- Joo, C. H., Y. C. Shin, M. Gack, L. G. Wu, D. Levy, and J. U. Jung. 2007. 'Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3', *Journal of Virology*, 81:8282-92.
- Karpova, A. Y., L. V. Ronco, and P. M. Howley. 2001. 'Functional characterization of interferon regulatory factor 3 $\alpha$  (IRF-3 $\alpha$ ), an alternative splice isoform of IRF-3', *Molecular and Cellular Biology*, 21:4169-76.
- Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. 'Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response', *Immunity*, 23:19-28.
- Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. R. E. Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. 2006. 'Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses', *Nature*, 441:101-5.
- Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. 'IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction', *Nature Immunology*, 6:981-8.
- Kim, T. W., K. Staschke, K. Bulek, J. H. Yao, K. Peters, K. H. Oh, Y. Vandenburg, H. Xiao, W. Qian, T. Hamilton, B. Min, G. Sen, R. Gilmour, and X. X. Li. 2007. 'A critical role for IRAK4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity', *Journal of Experimental Medicine*, 204:1025-36.
- Kitagawa, Y., M. Yamaguchi, M. Zhou, M. Nishio, M. Itoh, and B. Gotoh. 2013. 'Human Parainfluenza Virus Type 2 V Protein Inhibits TRAF6-Mediated Ubiquitination of IRF7 To Prevent TLR7-and TLR9-Dependent Interferon Induction', *Journal of Virology*, 87:7966-76.
- Komuro, A., and C. M. Horvath. 2006. 'RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2', *Journal of Virology*, 80:12332-42.
- Kubota, T., M. Matsuoka, T. H. Chang, P. Taylor, T. Sasaki, M. Tashiro, A. Kato, and K. Ozato. 2008. 'Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression', *Journal of Biological Chemistry*, 283:25660-70.
- Kumar, K. P., K. M. McBride, B. K. Weaver, C. Dingwall, and N. C. Reich. 2000. 'Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1', *Molecular and Cellular Biology*, 20:4159-68.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. 2000. 'Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus', *Nature Immunology*, 1:398-401.
- Lang, T. L., C. Lo, N. Skinner, S. Locarnini, K. Visvanathan, and A. Mansell. 2011. 'The Hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the Toll-like receptor signaling pathway', *Journal of Hepatology*, 55:762-9.
- Lazear, H. M., A. Lancaster, C. Wilkins, M. S. Suthar, A. Huang, S. C. Vick, L. Clepper, L. Thackray, M. M. Brassil, H. W. Virgin, J. Nikolich-Zugich, A. V. Moses, M. Gale, K. Fruh, and M. S.

- Diamond. 2013. 'IRF-3, IRF-5, and IRF-7 Coordinately Regulate the Type I IFN Response in Myeloid Dendritic Cells Downstream of MAVS Signaling', *Plos Pathogens*, 9.
- Lei, X. B., Z. M. Sun, X. L. Liu, Q. Jin, B. He, and J. W. Wang. 2011. 'Cleavage of the Adaptor Protein TRIF by Enterovirus 71 3C Inhibits Antiviral Responses Mediated by Toll-Like Receptor 3', *Journal of Virology*, 85:8811-8.
- Lei, X. B., X. Xiao, Q. H. Xue, Q. Jin, B. He, and J. W. Wang. 2013. 'Cleavage of Interferon Regulatory Factor 7 by Enterovirus 71 3C Suppresses Cellular Responses', *Journal of Virology*, 87:1690-8.
- Lenardo, M. J., C. M. Fan, T. Maniatis, and D. Baltimore. 1989. 'The involvement of NF-kappaB in beta-interferon gene-regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction', *Cell*, 57:287-94.
- Leung, L. W., M. S. Park, O. Martinez, C. Valmas, C. B. Lopez, and C. F. Basler. 2011. 'Ebola virus VP35 suppresses IFN production from conventional but not plasmacytoid dendritic cells', *Immunology and Cell Biology*, 89:792-802.
- Li, C. H., L. X. Ma, and X. W. Chen. 2011. 'Interferon regulatory factor 3-CL, an isoform of IRF3, antagonizes activity of IRF3', *Cellular & Molecular Immunology*, 8:67-74.
- Li, K., E. Foy, J. C. Ferreón, M. Nakamura, A. C. M. Ferreón, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, and S. M. Lemon. 2005. 'Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:2992-7.
- Li, S. T., L. Y. Wang, M. Berman, Y. Y. Kong, and M. E. Dorf. 2011. 'Mapping a Dynamic Innate Immunity Protein Interaction Network Regulating Type I Interferon Production', *Immunity*, 35:426-40.
- Liang, D. G., Y. Gao, X. Z. Lin, Z. H. He, Q. L. Zhao, Q. Deng, and K. Lan. 2011. 'A human herpesvirus miRNA attenuates interferon signaling and contributes to maintenance of viral latency by targeting IKK epsilon', *Cell Research*, 21:793-806.
- Liang, Q. M., B. S. Fu, F. Y. Wu, X. J. Li, Y. Yuan, and F. X. Zhu. 2012. 'ORF45 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Inhibits Phosphorylation of Interferon Regulatory Factor 7 by IKK epsilon and TBK1 as an Alternative Substrate', *Journal of Virology*, 86:10162-72.
- Lien, C. Y., C. M. Fang, D. Huso, F. Livak, R. Q. Lu, and P. M. Pitha. 2010. 'Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:4664-8.
- Lin, R. T., P. Génin, Y. Mamane, and J. Hiscott. 2000b. 'Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7', *Molecular and Cellular Biology*, 20:6342-53.
- Lin, R. T., P. Génin, Y. Mamane, M. Sgarbanti, A. Battistini, W. J. Harrington, G. N. Barber, and J. Hiscott. 2001. 'HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators', *Oncogene*, 20:800-11.
- Lin, R. T., Y. Mamane, and J. Hiscott. 1999. 'Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: Localization of the transactivation and autoinhibitory domains', *Molecular and Cellular Biology*, 19:2465-74.
- Lin, R. T., Y. Mamane, J. Hiscott. 2000a. 'Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection', *Journal of Biological Chemistry*, 275:34320-7.
- Lin, R. T., L. Yang, M. Arguello, C. Penafuerte, and J. Hiscott. 2005. 'A CRM1-dependent nuclear export pathway is involved in the regulation of IRF-5 subcellular localization', *Journal of Biological Chemistry*, 280:3088-95.
- Lu, G., J. T. Reinert, I. Pitha-Rowe, A. Okumura, M. Kellum, K. P. Knobloch, B. Hassel, and P. M.

- Pitha. 2006. 'ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation', *Cellular and Molecular Biology*, 52:29-41.
- Lu, R. Q., P. A. Moore, and P. M. Pitha. 2002. 'Stimulation of IRF-7 gene expression by tumor necrosis factor alpha - Requirement for NF kappa B transcription factor and gene accessibility', *Journal of Biological Chemistry*, 277:16592-8.
- Ma, Y. J., H. L. Jin, T. Valyi-Nagy, Y. J. Cao, Z. P. Yan, and B. He. 2012. 'Inhibition of TANK Binding Kinase 1 by Herpes Simplex Virus 1 Facilitates Productive Infection', *Journal of Virology*, 86:2188-96.
- Mancl, M. E., G. D. Hu, N. Sangster-Guity, S. L. Olshalsky, K. Hoops, P. Fitzgerald-Bocarsly, P. M. Pitha, K. Pinder, and B. J. Barnes. 2005. 'Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms', *Journal of Biological Chemistry*, 280:21078-90.
- Marie, I., J. E. Durbin, and D. E. Levy. 1998. 'Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7', *Embo Journal*, 17:6660-9.
- Marie, I., E. Smith, A. Prakash, and D. E. Levy. 2000. 'Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain', *Molecular and Cellular Biology*, 20:8803-14.
- Matthys, V. S., V. Cimica, N. A. Dalrymple, N. B. Glennon, C. Bianco, and E. R. Mackow. 2014. 'Hantavirus GnT Elements Mediate TRAF3 Binding and Inhibit RIG-I/TBK1-Directed Beta Interferon Transcription by Blocking IRF3 Phosphorylation', *Journal of Virology*, 88:2246-59.
- Merika, M., A. J. Williams, G. Y. Chen, T. Collins, and D. Thanos. 1998. 'Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription', *Molecular Cell*, 1:277-87.
- Mogensen, K. E., M. Lewerenz, J. Reboul, G. Lutfalla, and G. Uze. 1999. 'The type I interferon receptor: Structure, function, and evolution of a family business', *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19:1069-98.
- Mori, M., M. Yoneyama, T. Ito, K. Takahashi, F. Inagaki, and T. Fujita. 2004. 'Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation', *Journal of Biological Chemistry*, 279:9698-702.
- Mori, T., Y. Anazawa, M. Iizumi, S. Fukuda, Y. Nakamura, and H. Arakawa. 2002. 'Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53', *Oncogene*, 21:2914-8.
- Morin, P., J. Braganca, M. T. Bandu, R. Lin, J. Hiscott, J. Doly, and A. Civas. 2002. 'Preferential binding sites for interferon regulatory factors 3 and 7 involved in interferon-A gene transcription', *Journal of Molecular Biology*, 316:1009-22.
- Mutocheluh, M., L. Hindle, C. Areste, S. A. Chanas, L. M. Butler, K. Lowry, K. Shah, D. J. Evans, and D. J. Blackburn. 2011. 'Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor-2 inhibits type 1 interferon signalling by targeting interferon-stimulated gene factor-3', *Journal of General Virology*, 92:2394-8.
- Ning, S. B., A. D. Campos, B. G. Darnay, G. L. Bentz, and J. S. Pagano. 2008. 'TRAF6 and the three C-terminal lysine sites on IRF7 are required for its ubiquitination-mediated activation by the tumor necrosis factor receptor family member latent membrane protein 1', *Molecular and Cellular Biology*, 28:6536-46.
- Ning, S. B., L. E. Huye, and J. S. Pagano. 2005. 'Regulation of the transcriptional activity of the IRF7 promoter by a pathway independent of interferon signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 280:12262-70.
- Ning, S., A. M. Hahn, L. E. Huye, and J. S. Pagano. 2003. 'Interferon regulatory factor 7 regulates expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: a regulatory circuit', *Journal of*



- Virology*, 77:9359-68.
- Nousiainen, L., M. Sillanpää, M. Jiang, J. Thompson, J. Taipale, and I. Julkunen. 2013. 'Human kinome analysis reveals novel kinases contributing to virus infection and retinoic-acid inducible gene I-induced type I and type III IFN gene expression', *Innate Immunity*, 19:516-30.
- Oganesyan, G., S. K. Saha, B. C. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. H. Cheng. 2006. 'Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response', *Nature*, 439:208-11.
- Okumura, A., T. Alce, B. Lubyova, H. Ezelle, K. Strebel, and P. M. Pitha. 2008. 'HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation', *Virology*, 373:85-97.
- Panne, D., T. Maniatis, and S. C. Harrison. 2007. 'An atomic model of the interferon-beta enhanceosome', *Cell*, 129:1111-23.
- Paris, M. J., and B. R. G. Williams. 2000. 'Characterization of a 500-kb contig spanning the region between c-Ha-Ras and MUC2 on chromosome 11p15.5', *Genomics*, 69:196-202.
- Paun, A., J. T. Reinert, Z. Jiang, C. Medin, M. Y. Balkhi, K. A. Fitzgerald, and P. M. Pitha. 2008. 'Functional characterization of murine interferon regulatory factor 5 (IRF-5) and its role in the innate antiviral response', *Journal of Biological Chemistry*, 283:14295-308.
- Paz, S., Q. Sun, P. Nakhaei, R. Romieu-Mourez, D. Goubau, I. Julkunen, R. Lin, and J. Hiscott. 2006. 'Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway', *Cellular and Molecular Biology*, 52:17-28.
- Pfaller, C. K., and K. K. Conzelmann. 2008. 'Measles Virus V Protein Is a Decoy Substrate for I kappa B Kinase alpha and Prevents Toll-Like Receptor 7/9-Mediated Interferon Induction', *Journal of Virology*, 82:12365-73.
- Prakash, A., and D. E. Levy. 2006. 'Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342:50-6.
- Pythoud, C., W. Rodrigo, G. Pasqual, S. Rothenberger, L. Martinez-Sobrido, J. C. de la Torre, and S. Kunz. 2012. 'Arenavirus Nucleoprotein Targets Interferon Regulatory Factor-Activating Kinase IKK epsilon', *Journal of Virology*, 86:7728-38.
- Qin, B. Y., C. Liu, H. Srinath, S. S. Lam, J. J. Correia, R. Derynck, and K. Lin. 2005. 'Crystal structure of IRF-3 in complex with CBP', *Structure*, 13:1269-77.
- Rechsteiner, M., and S. W. Rogers. 1996. 'PEST sequences and regulation by proteolysis', *Trends in Biochemical Sciences*, 21:267-71.
- Reis, L. F. L., H. Ruffner, G. Stark, M. Aguet, and C. Weissmann. 1994. 'Mice devoid of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) show normal expression of type-I interferon genes', *Embo Journal*, 13:4798-806.
- Ren, J. P., T. S. Liu, L. Pang, K. Li, R. P. Garofalo, A. Casola, and X. Y. Bao. 2011. 'A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein', *Journal of General Virology*, 92:2153-9.
- Roffet, P., S. Lopez, S. Navarro, M. T. Bandu, C. Coulombel, M. Vignal, J. Doly, and G. Vlodavsky. 1996. 'Identification of distal silencing elements in the murine interferon- $\alpha$ 1 gene promoter', *Biochemical Journal*, 317:697-706.
- Saito, T., R. Hirai, Y. M. Loo, D. Owen, C. L. Johnson, S. C. Sinha, S. Akira, T. Fujita, and M. Gale. 2007. 'Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:582-7.
- Saitoh, T., A. Tun-Kyi, A. Ryo, M. Yamamoto, G. Finn, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto, K. P. Lu, and S. Yamaoka. 2006. 'Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate

- antiviral response by the prolyl isomerase Pin1', *Nature Immunology*, 7:598-605.
- Sarkar, S. N., K. L. Peters, C. P. Elco, S. Sakamoto, S. Pal, and G. C. Sen. 2004. 'Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling', *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:1060-7.
- Sato, M., N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 1998. 'Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7', *Febs Letters*, 441:106-10.
- Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi. 2000. 'Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction', *Immunity*, 13:539-48.
- Satoh, T., H. Kato, Y. Kumagai, M. Yoneyama, S. Sato, K. Matsushita, T. Tsujimura, T. Fujita, S. Akira, and O. Takeuchi. 2010. 'LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:1512-7.
- Schafer, S. L., R. T. Lin, P. A. Moore, J. Hiscott, and P. M. Pitha. 1998. 'Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3', *Journal of Biological Chemistry*, 273:2714-20.
- Schmitz, F., A. Heit, S. Dreher, K. Eisenacher, J. Mages, T. Haas, A. Krug, K. P. Janssen, C. J. Kirschning, and H. Wagner. 2008. 'Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells', *European Journal of Immunology*, 38:2981-92.
- Schoenemeyer, A., B. J. Barnes, M. E. Mancl, E. Latz, N. Goutagny, P. M. Pitha, K. A. Fitzgerald, and D. T. Golenbock. 2005. 'The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 280:17005-12.
- Sharma, S., B. R. tenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. T. Lin, and J. Hiscott. 2003. 'Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway', *Science*, 300:1148-51.
- Shi, H. X., K. Yang, X. Liu, X. Y. Liu, B. Wei, Y. F. Shan, L. H. Zhu, and C. Wang. 2010. 'Positive Regulation of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Herc5 via ISG15 Modification', *Molecular and Cellular Biology*, 30:2424-36.
- Sousa, F., C. Cruz, and J. A. Queiroz. 2010. 'Amino acids-nucleotides biomolecular recognition: from biological occurrence to affinity chromatography', *Journal of Molecular Recognition*, 23:505-18.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker, and J. B. Hogenesch. 2004. 'A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:6062-7.
- Takahashi, K., N. N. Suzuki, M. Horiuchi, M. Mori, W. Suhara, Y. Okabe, Y. Fukuhara, H. Terasawa, S. Akira, T. Fujita, and F. Inagaki. 2003. 'X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications', *Nature Structural Biology*, 10:922-7.
- Takaoka, A., Z. Wang, M. K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohba, and T. Taniguchi. 2007. 'DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response', *Nature*, 448:501-U14.
- Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. 'Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors', *Nature*, 434:243-9.
- tenOever, B. R., S. Sharma, W. Zou, Q. Sun, N. Grandvaux, I. Julkunen, H. Hemmi, M. Yamamoto, S. Akira, W. C. Yeh, R. T. Lin, and J. Hiscott. 2004. 'Activation of TBK1 and IKK epsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the

- development of interferon antiviral immunity', *Journal of Virology*, 78:10636-49.
- Thanos, D., and T. Maniatis. 1995. 'Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome', *Cell*, 83:1091-100.
- Tun-Kyi, A., G. Finn, A. Greenwood, M. Nowak, T. H. Lee, J. M. Asara, G. C. Tsokos, K. Fitzgerald, E. Israel, X. X. Li, M. Exley, L. K. Nicholson, and K. P. Lu. 2011. 'Essential role for the prolyl isomerase Pin1 in Toll-like receptor signaling and type I interferon-mediated immunity', *Nature Immunology*, 12:733-U142.
- Uematsu, S., S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotani, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K. J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. 'Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon-alpha induction', *Journal of Experimental Medicine*, 201:915-23.
- Unterholzner, L., R. P. Sumner, M. Baran, H. W. Ren, D. S. Mansur, N. M. Bourke, F. Randow, G. L. Smith, and A. G. Bowie. 2011. 'Vaccinia Virus Protein C6 Is a Virulence Factor that Binds TBK-1 Adaptor Proteins and Inhibits Activation of IRF3 and IRF7', *Plos Pathogens*, 7.
- Vandevenne, P., M. Lebrun, N. El Mjiyad, I. Ote, E. Di Valentin, Y. Habraken, E. Dortu, J. Piette, and C. Sadzot-Delvaux. 2011. 'The Varicella-Zoster Virus ORF47 Kinase Interferes with Host Innate Immune Response by Inhibiting the Activation of IRF3', *Plos One*, 6.
- Wang, S., K. Z. Wang, R. T. Lin, and C. F. Zheng. 2013. 'Herpes Simplex Virus 1 Serine/Threonine Kinase US3 Hyperphosphorylates IRF3 and Inhibits Beta Interferon Production', *Journal of Virology*, 87:12814-27.
- Wathelet, M. G., C. H. Lin, B. S. Parekh, L. V. Ronco, P. M. Howley, and T. Maniatis. 1998. 'Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo', *Molecular Cell*, 1:507-18.
- Wies, E., A. S. Hahn, K. Schmidt, C. Viebahn, N. Rohland, A. Lux, T. Schellhorn, A. Holzer, J. U. Jung, and F. Neipel. 2009. 'The Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus-encoded vIRF-3 Inhibits Cellular IRF-5', *Journal of Biological Chemistry*, 284:8525-38.
- Woelk, C. H., S. D. W. Frost, D. D. Richman, P. E. Higley, and S. L. K. Pond. 2007. 'Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals', *Gene*, 397:38-50.
- Wu, J. X., L. J. Sun, X. Chen, F. H. Du, H. P. Shi, C. Chen, and Z. J. J. Chen. 2013. 'Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA', *Science*, 339:826-30.
- Wu, L., E. Fossum, C. H. Joo, K. S. Inn, Y. C. Shin, E. Johannsen, L. M. Hutt-Fletcher, J. Hass, and J. U. Jung. 2009. 'Epstein-Barr Virus LF2: an Antagonist to Type I Interferon', *Journal of Virology*, 83:1140-6.
- Xu, D. S., F. Meyer, E. Ehlers, L. Blasnitz, and L. W. Zhang. 2011. 'Interferon Regulatory Factor 4 (IRF-4) Targets IRF-5 to Regulate Epstein-Barr Virus Transformation', *Journal of Biological Chemistry*, 286:18261-7.
- Xu, W. D., H. F. Pan, Y. K. Xu, and D. Q. Ye. 2013. 'Interferon regulatory factor 5 and autoimmune lupus', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15.
- Yang, H. M., C. H. Lin, G. Ma, M. O. Baffi, and M. G. Wathelet. 2003. 'Interferon regulatory factor-7 synergizes with other transcription factors through multiple interactions with p300/CBP coactivators', *Journal of Biological Chemistry*, 278:15495-504.
- Yang, L., T. J. Zhao, X. L. Shi, P. Nakhaei, Y. L. Wang, Q. Sun, J. Hiscott, and R. T. Lin. 2009. 'Functional Analysis of a Dominant Negative Mutation of Interferon Regulatory Factor 5', *Plos One*, 4.
- Yang, Y. B., C. Yin, A. Pandey, D. Abbott, C. Sasseti, and M. A. Kelliher. 2007. 'NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2', *Journal of Biological Chemistry*, 282:36223-9.

- Ye, J. Q., and T. Maniatis. 2011. 'Negative Regulation of Interferon-beta Gene Expression during Acute and Persistent Virus Infections', *Plos One*, 6.
- Yeow, W. S., W. C. Au, W. J. Lowther, and P. M. Pitha. 2001. 'Downregulation of IRF-3 levels by ribozyme modulates the profile of IFNA subtypes expressed in infected human cells', *Journal of Virology*, 75:3021-7.
- Yie, J. M., S. Liang, M. Merika, and D. Thanos. 1997. 'Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter', *Molecular and Cellular Biology*, 17:3649-62.
- Yie, J. M., M. Merika, N. Munshi, G. Y. Chen, and D. Thanos. 1999. 'The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome', *Embo Journal*, 18:3074-89.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita. 2005. 'Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity', *Journal of Immunology*, 175:2851-8.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. 'The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses', *Nature Immunology*, 5:730-7.
- Yoneyama, M., W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukuda, E. Nishida, and T. Fujita. 1998. 'Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300', *Embo Journal*, 17:1087-95.
- Yu, Y. X., S. Z. E. Wang, and G. S. Hayward. 2005. 'The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteosome-mediated degradation', *Immunity*, 22:59-70.
- Zhang, L. W., and J. S. Pagano. 1997. 'IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency', *Molecular and Cellular Biology*, 17:5748-57.
- Zhang, L. W., L. H. Wu, K. Hong, and J. S. Pagano. 2001. 'Intracellular signaling molecules activated by Epstein-Barr virus for induction of interferon regulatory factor 7', *Journal of Virology*, 75:12393-401.
- Zhu, H. F., C. F. Zheng, J. J. Xing, S. Wang, S. P. Li, R. T. Lin, and K. L. Mossman. 2011. 'Varicella-Zoster Virus Immediate-Early Protein ORF61 Abrogates the IRF3-Mediated Innate Immune Response through Degradation of Activated IRF3', *Journal of Virology*, 85:11079-89.